



# Régulation du facteur de transcription SNAIL1 au cours de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse dans les cellules mammaires MCF10A : implication de la protéine-kinase CK2

Alexandre Deshiere

## ► To cite this version:

Alexandre Deshiere. Régulation du facteur de transcription SNAIL1 au cours de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse dans les cellules mammaires MCF10A : implication de la protéine-kinase CK2. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00568927

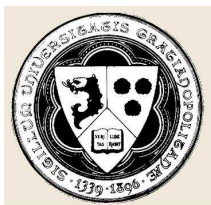
**HAL Id: tel-00568927**

**<https://theses.hal.science/tel-00568927>**

Submitted on 1 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

# THÈSE

*Pour obtenir le grade de :*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**

**Spécialité : Biodiversité du Développement et Oncogénèse**

*Présentée et soutenue publiquement par :*

**Alexandre DESHIÈRE**

Le 9 Novembre 2010

**Régulation du facteur de transcription SNAIL1 au cours de la Transition  
Épithélio-Mésenchymateuse dans les cellules mammaires MCF10A :  
implication de la protéine-kinase CK2**

Thèse dirigée par Jacques BAUDIER et Odile FILHOL-COCHET

*Devant le jury composé de :*

Stefan NONCHEV	Pr, Grenoble	<i>Président</i>
Pierre SAVAGNER	CR, Montpellier	<i>Rapporteur</i>
Marc BILLAUD	DR, Lyon	<i>Rapporteur</i>
Isabelle VAN SEUNINGEN	DR, Lille	<i>Examineur</i>
Séverine LÉTUVÉ	MCF, Paris	<i>Examineur</i>
Jacques BAUDIER	DR, Grenoble	<i>Examineur</i>
Odile FILHOL-COCHET	CR, Grenoble	<i>Examineur</i>

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Transduction du Signal : Signalisation calcique, Phosphorylation et  
Inflammation - INSERM U873 - iRTSV - CEA GRENOBLE  
Dans l'Ecole Doctorale Chimie – Sciences du Vivant

« La loi de l'évolution est la plus importante de toutes les lois du monde parce qu'elle a présidé notre naissance, qu'elle a régit notre passé, et dans une large mesure, elle contrôle notre avenir. »

*[Yves Coppens]*

« On est obligés de regarder l'imposant spectacle de l'évolution de la vie comme un ensemble d'événements extraordinairement improbables, impossibles à prédire et tout à fait non reproductibles. »

*[Stephen Jay Gould]*

« Le jeu de la Science est en principe sans fin. Celui-là se retire du jeu qui décide un jour que les énoncés scientifiques ne requièrent pas de test ultérieur et peuvent être considérés comme définitivement vérifiés. »  
[...] « Une théorie qui n'est réfutable par aucun événement qui puisse se concevoir est dépourvue de caractère scientifique. »

*[Karl Popper]*

« Une civilisation sans la science, ce serait aussi absurde qu'un poisson sans bicyclette. »

*[Pierre Desproges]*

*À ma mère et à mes grands parents,*

*à la mémoire de mon père.*

# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

<b>CHAPITRE I : La cellule épithéliale, un « chef-d'œuvre de l'évolution ».....</b>	<b>3</b>
---	----------

A. Organisation moléculaire des cellules épithéliales .....	5
B. Le cytosquelette des cellules épithéliales .....	7
1 - Les microfilaments d'actine .....	8
1.1. Organisation générale .....	8
1.2. Macrostructures et réseaux d'actine .....	10
1.3. Régulation : la famille des Rho GTPases .....	11
2 - Les microtubules .....	12
2.1. Dynamique et régulation .....	12
2.2. Interactions des microtubules avec le réseau d'actine .....	13
3 - Les filaments intermédiaires .....	14
C. Les complexes jonctionnels intercellulaires .....	16
1 - Les jonctions serrées (TJs : Tight Junctions) .....	17
2 - Les jonctions adhérentes (AJs : Adherens junctions) .....	18
2.1. La superfamille des cadhérines .....	18
2.2. Structure de la E-cadhérine .....	19
2.3. Le chaînon indispensable : les caténines .....	21
3 - Desmosomes et cadhérines desmosomales .....	22
4 - Les jonctions communicantes (Gap junctions) .....	23
D. Les complexes jonctionnels cellule-matrice .....	24
1 - La membrane basale .....	24
1.1. Organisation générale .....	24
1.2. Composants moléculaires de la lame basale .....	24
2 - Interactions avec la lame basale : contacts cellule / matrice .....	25
2.1. Les intégrines .....	25
2.2. Les hémidesmosomes .....	25
2.3. Contacts focaux dans les cellules épithéliales .....	27

<b>CHAPITRE II : Plasticité des tissus épithéliaux.....</b>	<b>29</b>
---	-----------

A. Généralités .....	29
1 - Plasticité épithéliale et transdifférenciation .....	29
2 - La néoplasie .....	30
B. Le concept de transition épithélio-mésenchymateuse .....	31
1 - Définition .....	31
2 - Historique de la découverte et évolution de la définition .....	32



<b>C. Fonctions biologiques de l'EMT et modèles de classification</b>	<b>33</b>
1 - Développement embryonnaire et organogenèse (type 1)	34
1.1. EMT dans les tissus épithéliaux primaires	34
1.2. EMT secondaire et tertiaire	37
2 - Cicatrisation et fibroses (type 2)	40
2.1. Cicatrisation et régénération tissulaire	40
2.2. Fibroses	40
3 - Relevance de l'EMT dans la tumorigenèse (type 3)	41
4 - EMT dans les lignées cellulaires	41
<b>D. Le mythe de la cellule «fibroblastoïde»</b>	<b>43</b>
1 - Cellule mésenchymateuse ou fibroblaste ?	43
2 - Caractéristiques des cellules fibroblastoïdes	43
3 - Cellules mésenchymateuses et fibroblastiques dans les carcinomes	45
3.1. Les fibroblastes de l'environnement tumoral (TAFs)	47
3.2. La cellule souche «onco-mésenchymateuse» : mirage ou réalité ?	50
3.3. Modèle de la dispersion métastatique	51

<b>CHAPITRE III : Effecteurs de l'EMT et composants moléculaires des cellules fibroblastoïdes</b> ..... <b>53</b>
---

<b>A. Bio-marqueurs de l'EMT</b>	<b>53</b>
<b>B. Destructuration des jonctions intercellulaires</b>	<b>55</b>
1 - Le «switch» des cadhérines	55
1.1. Répression de la E-cadhérine	55
1.2. Cadhérines surexprimées pendant l'EMT	57
2 - Jonctions serrées et desmosomes	57
3 - Protéines de la famille des Ig-CAM	58
<b>C. Remodelage des filaments intermédiaires : expression de la vimentine</b>	<b>59</b>
<b>D. Cytosquelette d'actine et cycles de la migration cellulaire</b>	<b>61</b>
1 - Modèle général : les cycles d'extension / contraction / rétraction	61
2 - Formation du lamellipode	62
3 - Mécanismes moléculaires de la contraction des fibres de stress	63
3.1. Maturation des contacts focaux et des fibres de stress	63
3.2. Cascade d'activation de la Myosine II	63
4 - La rétraction membranaire	64
5 - Les mouvements amiboïdes	65
6 - EMT partielle et migration en chaîne	65

<b>CHAPITRE IV : Signalisation cellulaire de l'EMT</b> ..... <b>67</b>
--

<b>A. Cytokines et médiateurs intracellulaires de l'EMT dans la glande mammaire</b>	<b>67</b>
1 - La voie Wnt / $\beta$ -caténine	69
1.1. Régulation de la localisation et de la dégradation de la $\beta$ -caténine	69
1.2. Rôle des ligands Wnt	71
1.3. Régulation de la transcription par le complexe TCF/LEF/ $\beta$ -caténine	72
1.4. Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la tumorigenèse	72

2 -	La voie TGF $\beta$ .....	73
2.1.	La superfamille des ligands TGF $\beta$ .....	73
2.2.	Le TGF $\beta$ au «sommet de la pyramide de l'EMT» .....	74
3 -	Voies non canoniques et interactions du TGF $\beta$ avec les autres facteurs de croissance .....	76
3.3.	La voie NF- $\kappa$ B .....	79
3.4.	La protéine-kinase GSK3 $\beta$ comme «rempart» de l'EMT .....	80
3.5.	Autres voies de signalisation .....	82
<b>B.</b>	<b>Facteurs de transcription de l'EMT</b> .....	85
1 -	Activation et gènes cibles .....	85
2 -	La famille des facteurs bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) .....	88
3 -	La famille ZEB (Zinc E-box Binding factor) .....	89
4 -	La superfamille SNAIL .....	90
<b>C.</b>	<b>Régulation de l'expression de <i>SNAIL1</i> au cours de l'EMT</b> .....	92
1 -	Expression physio-pathologique de <i>SNAIL1</i> .....	92
2 -	Régulation transcriptionnelle du gène <i>SNAIL</i> .....	93
2.1.	Rétrocontrôles positifs .....	95
2.2.	Rétrocontrôles négatifs .....	96
2.3.	Boucles d'auto-régulation .....	97
3 -	Régulation post-transcriptionnelle par les miRNAs .....	98
4 -	Régulation post-traductionnelle .....	99
4.1.	Modèle de régulation par les kinases CK1 et GSK3 $\beta$ .....	101
4.2.	Autres modifications post-traductionnelles .....	102

<b>CHAPITRE V : La protéine-kinase CK2 .....</b>	<b>105</b>
--	------------

<b>A.</b>	<b>Les protéine-kinases</b> .....	105
1 -	La superfamille des protéine-kinases .....	105
2 -	Catalyse de la phosphorylation des acides aminés .....	107
3 -	Le domaine catalytique .....	108
<b>B.</b>	<b>Structure des sous-unités de la protéine-kinase CK2</b> .....	109
1 -	La sous-unité catalytique CK2 $\alpha$ .....	109
1.1.	Une structure bien définie... ..	109
1.2.	... Mais une régulation pour le moins énigmatique .....	109
1.3.	Spécificité de reconnaissance des substrats .....	110
2 -	Particularités de l'isoforme CK2 $\alpha'$ .....	111
3 -	Structure de la sous-unité régulatrice CK2 $\beta$ .....	112
<b>C.</b>	<b>Assemblage dynamique des sous-unités</b> .....	113
1 -	Assemblage hétérotétramérique .....	113
2 -	Macrocomplexes quaternaires .....	115
<b>D.</b>	<b>Fonctions de la sous-unité régulatrice CK2<math>\beta</math></b> .....	116
1 -	Reconnaissance des substrats .....	116
2 -	Localisation cellulaire du complexe hétérotétramérique .....	117
3 -	Interstabilisation des sous-unités CK2 .....	117
4 -	Fonctions indépendantes de CK2 $\alpha$ .....	117

## ***Résultats..... 119***

- A. *Contexte scientifique et Objectifs* ..... 121
- B. *Article* ..... 123
- C. *Résultats complémentaires (Extra Data)* ..... 151

## ***Conclusions et perspectives ..... 185***

- A. *Régulation transcriptionnelle de SNAIL1 dans les cellules MCF10A* ..... 187
- B. *Régulation post-traductionnelle de la protéine SNAIL1* ..... 190
- C. *Perspectives in vivo* ..... 192

## ***Références bibliographiques ..... 193***

# LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>A</b> : adénine ou alanine (ala)	<b>CREB</b> : cAMP Response Element-Binding
<b>Ab</b> : Antibody	<b>CSCs</b> : Cancer Stem Cell
<b>ABL</b> : Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	<b>CSN2/COP9</b> : Constitutive photomorphogenic Arabidopsis homolog, unit 2
<b>ABP</b> : Actin Binding Protein	<b>CTBP</b> : Carboxy-Terminal Binding Protein
<b>Ac</b> : Anticorps	<b>CTGF</b> : Connective Tissue Growth Factor
<b>Actine F</b> : Actine Filamenteuse	<b>CXCR4</b> : chemokine (C-X-C motif) receptor 4
<b>Actine G</b> : Actine Globulaire	<b>D</b> : aspartate / acide aspartique (asp)
<b>ADAM</b> : ADAM Metalloprotéinase	<b>DAPI</b> : 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>ADF</b> : Actin Depolymerizing Factor	<b>DB</b> : Destruction Box
<b>ADN / DNA</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>deltaEF1</b> : delta-cristallin Enhancer Factor 1
<b>ADNc / cDNA</b> : ADN complémentaire	<b>DKK1</b> : secreted Dickkopf xenopus laevis homolog 1
<b>ADP</b> : Adenosine-5' DiPhosphate	<b>DLG</b> : Drosophila Discs Large homolog
<b>Akt/PKB</b> : rac-beta serine/threonine protein kinase	<b>DMEM</b> : Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>ALK</b> : Anaplastic Lymphoma receptor tyrosine Kinase	<b>DMSO</b> : Diméthyl Sulphoxyde
<b>AMP</b> : Adenosine-5' MonoPhosphate	<b>dNTP</b> : désoxyribonucléotide
<b>AMPc</b> : Adenosine-3',5' MonoPhosphate cyclique	<b>DO</b> : Densité optique
<b>AMPK</b> : AMP activated Kinase	<b>DP</b> : Desmoplakine
<b>ANGPTL4</b> : Angiopoietin-related protein 4	<b>DSC</b> : Desmocolline
<b>AP1</b> : Activated Protein-1	<b>DSG</b> : Desmoglénine
<b>APC</b> : Adenomatous Polyposis Coli protein	<b>DSH/DVL</b> : Dishevelled protein
<b>ARFRP1</b> : ADP-ribosylation factor-related protein 1	<b>DTT</b> : DiThioThreitol
<b>ARNm</b> : Acide RiboNucléique messager	<b>E</b> : acide glutamique (glu)
<b>ARP2/3</b> : Actin Related Proteins	<b>EC</b> : Ectodomaine / Extracellulaire
<b>ATF1/2</b> : Cyclic AMP-dependent transcription factors	<b>ECL</b> : Enhanced Luminol-based Chemiluminescent
<b>ATP</b> : Adenosine-5' TriPhosphate	<b>ECM</b> : ExtraCellular Matrix
<b>BF-A</b> : CCAAT motif-Binding Factor-A	<b>EDTA</b> : Ethylène Diamine Tétra Acétique
<b>bHLH</b> : Helix-Loop-Helix	<b>EGF</b> : Epidermal Growth Factor
<b>BMDC</b> : Bone Marrow-Derived Cell	<b>EGF-R</b> : Epidermal Growth Factor Receptor
<b>BMP</b> : Bone Morphogenic Protein	<b>EGR1</b> : Early Growth Response 1
<b>BP</b> : Binding Protein	<b>EMT</b> : Epithelial-Mesenchymal Transition
<b>BPAG</b> : Bullous Pemphigoid Antigen	/ Transition Epithélio-Mésenchymateuse
<b>BRMS</b> : Breast cancer Metastasis Suppressor	<b>EMT-TF</b> : EMT-Transcription Factor
<b>BSA</b> : Serum Albumine Bovine	<b>ENU</b> : N-ethyl N-nitro-sourea
<b>bZIP-TFs</b> : basic region / leucine ZIPper motif Transcription Factors	<b>ERBB</b> : EGF-R : Epidermal Growth Factor Receptor
<b>C</b> : carbone ou cytosine ou cystéine (cys)	<b>ERK</b> : Extracellular Regulated MAP Kinase
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : Calcium	<b>ERα</b> : Estrogen Receptor alpha
<b>CaCl<sub>2</sub></b> : Chlorure de Calcium	<b>ESC</b> : Embryonic Stem Cells
<b>CAF</b> : Cancer Associated Fibroblast	<b>ETS1 / ETV1</b> : E-Twenty-six, Variant 1
<b>CAM</b> : Cell Adhesion Molecule	<b>ETS1</b> : v-ets Erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
<b>CAMK</b> : Calcium/calmoduline-dependent protéine-kinase	<b>F</b> : phénylalanine (phé) ou fluor
<b>CapZ</b> : Capping protein Z	<b>FACS</b> : Fluorescence-Activated Cell Sorting
<b>CD</b> : Cluster of Differentiation	<b>FAK</b> : Focal Adhesion Kinase
<b>Cdc42</b> : Cell division control protein 42 homolog	<b>FAPα</b> : fibroblast activation protein, alpha
<b>CDH</b> : Cadherin	<b>FBS</b> : Fetal Bovine Serum
<b>CDK</b> : Cyclin Dependent Kinase	<b>FBXL14</b> : F-Box and Leucine-rich repeat protein 14
<b>CHD (Mi1)</b> : Chromodomain Helicase DNA binding protein	<b>FER</b> : Fer (fps/fes related) tyrosine kinase
<b>CHK</b> : Serine/threonine-protein kinase Chk homolog	<b>FGF</b> : Fibroblast Growth Factor
<b>CK1</b> : Casein-Kinase 1 ( <i>anciennement</i> )	<b>FITC</b> : Fluoresceine Iso Thio Cyanate
/ protein-kinase CK1 ( <i>nouvellement</i> )	<b>FOX</b> : mésenchyme Forkhead box
<b>CK2</b> : Casein-Kinase 2 ( <i>anciennement</i> )	<b>FSP1</b> : Fibroblast Specific Protein 1
/ protein-kinase CK2 ( <i>nouvellement</i> )	<b>FTS1</b> : Fibroblast Transcription Site 1
<b>CKIP1</b> : CK2 Interacting Protein-1	<b>FYN</b> : FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
<b>c-MET</b> : MNNG HOS Transforming gene	<b>Fz</b> : Frizzled
<b>CMGC</b> : CDK-MAPK-GSK3-CLK	<b>G</b> : Guanine ou glycine (gly)
<b>COX2</b> : Cyclooxygénase 2	<b>GAG</b> : Glycosaminoglycane
<b>CRB</b> : Crumbs homolog	<b>GDP</b> : Guanosine-5' DiPhosphate

**GFAP** : Glio-Fibrillary acid Protein  
**GFP** : Green fluorescent Protein  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**GPI** : Glycophosphatidylinositol  
**Grb2** : Growth factor receptor-bound protein 2  
**GSC** : Goosecoid homolog  
**GSK3 $\beta$**  : Glycogen-Synthase Kinase 3 beta  
**GST** : Glutathione-S-Transferase  
**GTP** : Guanosine-5'TriPhosphate  
**H** : histidine (his) ou hydrogène  
**H/E-Spl ou Hes** : Hairy-enhancer of split  
**HA** : Hémagglutinine A du virus influenza  
**HAT** : Histone Acetyl-Transferase  
**HAV** : Histidine Alanine Valine  
**HDAC** : Histone DeAcetylase  
**HEK293** : Human Embryonic Kidney  
**HGF** : Hepatocyte Growth Factor  
**HIF1 $\alpha$**  : Hypoxia Induced Factor 1 alpha  
**HLH** : Helix Loop Helix  
**HMECs** : Human Mammary Epithelial Cells  
**HMGA2** : High Mobility Group, member A2  
**hPL** : hormone placentaire lactogène  
**HRP** : HorseRadish Peroxydase  
**HS** : DNase Hypersensitive Site  
**HSP90** : Heat Shock Protein-90kD  
**I** : isoleucine (ile) ou inositol  
**IC** : Inhibitory Concentration  
**ID** : Inhibitors of DNA binding  
**IF** : Immunofluorescence  
**IFAP** : Intermediate Filaments Associated Protein  
**IFs** : Intermediate Filaments  
**Ig** : Immunoglobuline  
**Ig-CAM** : Immunoglobuline-like Cell Adhesion Molecule  
**IGF** : Insulin Growth Factor  
**IKK** : I $\kappa$ -B Kinase  
**IL** : InterLeukine  
**ILK** : Integrin Link Kinase  
**IP** : Immunoprécipitation  
**IP<sub>3</sub>** : Inositol Triphosphate  
**IPSc** : Induced Pluripotent Stem cell  
**IPTG** : Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside  
**IQGAP** : Q motif containing GTPase Activating Protein  
**IRES** : Internal Ribosome Entry Site  
**I $\kappa$ -B** : Inhibitor of NF- $\kappa$ B  
**JAM** : Junctional Adhesion Molecule  
**JNK** : c-Jun N-terminal kinases  
**K** : lysine (lys) ou kinase  
**KAP-1/TRIM28** : TRIPartite Motif protein 28  
**KD** : Knock Down / atténuation génique par ARN interférence  
**kD** : kiloDalton (kDa)  
**KO** : Knock Out / invalidation génique par recombinaison  
**KRT** : cytoKeratin  
**L** : leucine (leu)  
**LAM** : Laminine  
**LAM** : Lamin  
**LAP** : Latent Associated Protein  
**LATS2** : Large Tumor Suppressor, drosophila homolog 2  
**LB** : Luria Broth medium  
**LBS** : LEF-Binding Site  
**LEF** : Lymphoid Enhancer binding Factor  
**LGL** : legless homolog  
**LIMK** : Kinase spécifique des protéines à domaine LIM  
**LKB1 / PAR4** : serine/threonine kinase LKB1  
**LOX** : Lysyl Oxydase  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**LRP5/6** : Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6  
**LSD1** : Lysine Specific Demethylase 1  
**LTBP** : Latent TGF $\beta$  Binding Protein  
**LYN** : v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog  
**M** : méthionine (met)  
**MAP** : Microtubule Associated Protein  
**MAPK** : Mitogen-Activated Kinase  
**MaSC** : Mammary Stem Cell  
**MB** : Membrane basale  
**MBD3 (Mi2)** : Methyl-CpG Binding Domain Protein-3  
**MBP** : Maltose Binding Protein  
**MCF10A** : Michigan Cancer Foundation, non transformed cell line 10A  
**MCF7** : Michigan Cancer Foundation, transformed cell line 7  
**MCPI1** : Monocyte Chemotactic Protein 1  
**MDCK** : Madin-Darby Canine Kidney  
**mDia** : mammalian Diaphanous-related formin 1  
**MDM2** : p53 binding protein homolog of transformed Mouse 3T3 cell Double Minute 2  
**MEC** : Matrice Extra-Cellulaire  
**MET** : Mesenchymal-Epithelial Transition / Transition Mésenchymo-Epithéliale  
**Mg<sup>2+</sup>** : Magnésium  
**miRNA / miR** : microRNA / microARN  
**MKP** : MAPKinases Phosphatase  
**MLCK** : Myosin Light Chain Kinase  
**MLCP** : Myosin Light Chain Phosphatase  
**MMP** : Matrix MetalloProteinase  
**mRNA** : messenger RiboNucleic Acid  
**MRU** : Mammary Recapitulation Unit  
**MSC** : Mesenchymal Stem Cell  
**MT** : Microtubule  
**MTA3** : Metastasis Associated family 1, member 3  
**MTOC** : MicroTubule Organizing Center  
**mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin  
**Mts1** : Metastatin1  
**MuSK** :Muscle, Skeletal, Receptor tyrosine Kinase  
**MYC** : Myelocytomatosis oncogene  
**N** : azote ou nucléotide ou asparagine (asn)  
**NES** : Nuclear Export Signal  
**NFY-A** : Nuclear transcription Factor Y-A  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Facor-kappaB  
**NLS** : Nuclear Localization Signal  
**NuRD** : Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation complex  
**O** : oxygène  
**P/S** : Penicillin / Streptomycin  
**P** : phosphate ou proline (pro)  
**p38IP** : p38 Interacting Protein  
**PAI** : plasminogen activator inhibitor  
**PAK1** : p21 Activated Kinase  
**PALS** : CTSC : Cathepsin C  
**PAR** : Partitionning defective proteins  
**PATJ** : INADL : InaD-like, drosophila homolog  
**pb** : paire(s) de bases  
**PBS** : Phosphate-Buffered Saline  
**PCDH** : Protocadherin  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PCR2** : Polycomb group Proteins, member 2 / H3K<sub>27</sub>-triméthylase  
**PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor  
**PGE2** : Prostaglandine E2  
**PGR-α** : Progesterone Receptor alpha  
**PH** : Plekstrin Homology  
**PI3K** : Phospho-Inositide-kinase  
**PIN1** : peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting protein 1  
**PIP** : Phospho-Inositide 4-Phosphate  
**PIP<sub>2</sub>** : Phosphoinositol-4, 5-bisphosphate  
**PIP<sub>3</sub>** : PI 3,4,5-trisphosphate  
**PK** : Protein Kinase  
**PKA** : Protein Kinase AMPc dependent  
**PKC** : protein kinase C  
**PKG** : Plakoglobine  
**PKP** : Plakophiline  
**PLC** : Phospholipase C  
**PM** : Poids Moléculaire  
**PMC** : Primary Mesenchymal Cell  
**PP2A** : sérine/thréonine Phosphatase 2A  
**PRC2** : Polycomb group Protein 2 / H3K<sub>27</sub>-tri-méthylase  
**PRL** : prolactine  
**PRMT1** : Protein-Arginine-MethylTransferase 1  
**PTEN** : Phosphatase and TENsin homolog  
**PTHrP** : parathyroid hormone-related protein  
**Q** : glutamine (gln)  
**R** : arginine (arg)  
**Rac1** : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
**Raf** : v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog  
**Ras** : Rat sarcoma  
**RBX1** : RING-box protein 1  
**REL** : Relish drosophila homolog  
**RHD** : Rel-Homolog Domain  
**RhoGAP** : GTPases Activating Protein  
**RhoGEF** : Guanine nucleotide Exchange Factor  
**RING** : Really Interesting New Gene  
**RISC** : RNA-Induced Silencing Complex  
**RNP** : RiboNucleoProtein  
**ROC1** : Rotamase CYP 1  
**ROCK** : Rho associated protein Kinase  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**RT** : Room Temperature / température ambiante  
**RT-qPCR** : Reverse Transcription – quantitative PCR  
**S** : sérine (ser) ou soufre  
**S6K1** : S6 Kinase 1  
**SBD** : Smad Binding Domain  
**SCP** : Small C-terminal domain Phosphatase  
**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate  
**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
**sFRP** : soluble/secreted Frizzled-Related Protein  
**shRNA** : small hairpin RNA / short hairpin RNA  
**SIP1** : Smad Interacting Protein 1  
**siRNA** : small interfering RNA / silencer RNA  
**SLC** : Small Light Cell  
**SLC39A6 / LIV1** : Solute Carrier family 39, member 6  
**SMA** : Smooth Muscle Actin alpha  
**Smads** : Similar to mothers against decapentaplegic homolog  
**SMUC** : Snail-related transcription factor of Muscle-Cells  
**SMURF1** : SMAD specific E3 Ubiquitin protein ligase 1  
**SNA** : Système Nerveux Autonaume  
**SNAG** : SNAIL and Gfi-1 oncoprotein specific domain  
**SNP** : Système Nerveux Périphérique  
**Sos** : Son of sevenless homolog  
**SP** : GC-rich Specific Protein  
**SPARC** : Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein  
**Src** : Rous Sarcoma virus oncoprotein homolog  
**SRD** : Serine Rich Domain  
**SRF** : Serum Response Factor  
**STE** : Sterile Kinase homologs  
**SVF** : Sérum de Veau Foetal  
**T** : thymine ou thréonine (thr)  
**TACE** : Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme  
**TAF** : Tumor Associated Fibroblast  
**TAK1** : TGFβ-Activated Kinase  
**TCF** : T-Cell specific Factor  
**TDLU** : Terminal Ducto-lobular Unit  
**TEB** : Terminal End Bud / bourgeon terminal  
**TEM** : TIE2-Expressing Monocytes  
**TEMPTIA** : The EMT International Association  
**TF** : Transcription Factor / Facteur de Transcription  
**TGFβ** : Transforming Growth Factor β  
**TGFβR** : Transforming Growth Factor β Receptor  
**TIMP** : Tissue Inhibitor of Matrix Proteases  
**TK** : Tyrosine-Kinase  
**TKL** : Tyrosine-Kinase-Like  
**TNF-α** : Tumor Necrosis Factor alpha  
**TP53** : Tumor Protein 53  
**tPAR / tPA** : tissue-type plasminogen activator  
**TrCP** : Transducin repeat Containing Protein  
**Tris** : Tris(hydroxymethyl)amino-methane 2 amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol  
**TURC** : Tubuline Ring Complex  
**Tween20** : Polyoxoethylene-sorbitan monolaurate  
**U** : uracyle  
**uPAR / uPA** : urokinase-type plasminogen activator  
**USP** : Ubiquitin-Specific Protease  
**UTDL** : Unité Terminale Ducto-Lobulaire  
**UTR** : UnTranslated Region  
**V** : valine (val)  
**VEGF** : Vascular-Endothelial Growth Factor  
**W** : tryptophane (trp)  
**WASP** : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein  
**WB** : Western blot  
**WIF** : Wnt Inhibitory Factor  
**WT** : Wild Type / sauvage  
**Y** : tyrosine (tyr)  
**YY1** : Yin Yang 1 transcription factor  
**ZEB** : Zinc-finger E-box Binding proteins  
**ZF** : Zinc Finger  
**Zn<sup>2+</sup>** : Zinc  
**ZO** : Zonula Occludens



# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation des cellules épithéliales dans l'organisme. ....	4
Figure 2 : Polarité apico-basale des cellules épithéliales. ....	6
Figure 3 : Représentations schématiques et photographies microélectroniques du cytosquelette des cellules épithéliales. ....	7
Figure 4 : Dynamique des microfilaments d'actine. ....	8
Figure 5 : Représentation schématique des différents réseaux d'actine existant dans les cellules épithéliales. ....	10
Figure 6 : Dynamique d'assemblage des microtubules. ....	13
Figure 7 : Représentation schématique et photographie microélectronique des filaments intermédiaires de cytokératine.....	15
Figure 8 : Représentation schématique des complexes jonctionnels dans les cellules épithéliales. ..	16
Figure 9 : Structure moléculaire des jonctions serrées. ....	17
Figure 10 : Complexes moléculaires organisant les jonctions adhérentes. ....	21
Figure 11 : Complexes moléculaires dans les jonctions adhérentes et desmosomes.....	23
Figure 12 : Composants de la membrane basale.....	26
Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation des hémidesmosomes. ....	27
Figure 14 : Modèle comparatif de l'organisation moléculaire des contacts focaux et des jonctions adhérentes.....	28
Figure 15 : Les étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	31
Figure 16 : Rôles multiples de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	33
Figure 17 : EMT primaire au cours de la formation du trophoblaste et du mésoderme. ....	36
Figure 18 : Contextes embryonnaires de l'EMT de type 1.....	38
Figure 19 : Plasticité des tissus épithéliaux. ....	42
Figure 20 : Comparaison des cellules fibroblastiques et mésenchymateuses primaires. ....	44
Figure 21 : Représentation schématique de la complexité de l'«homéostasie» tumorale. ....	46
Figure 22 : comparaison de l'organisation des fibroblastes sains et tumoraux. ....	48
Figure 23 : Evolution du modèle d'implication de l'EMT dans la progression métastatique des carcinomes.....	48
Figure 24 : Modèle revisité de l'EMT métastatique : «l'œuf ou la poule ?» .....	49
Figure 25 : Bio-marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	53
Figure 26 : Localisation cellulaire des filaments intermédiaires de cytokératines et vimentine. ....	60
Figure 27 : Organisation des fibres d'actine au cours de la migration cellulaire.....	62
Figure 28 : Maturation des complexes focaux en adhérences focales.....	64
Figure 29 : Migration collective des cellules épithéliales par EMT partielle. ....	66
Figure 30 : Diversité des voies de signalisation impliquées dans la modulation des gènes de l'EMT.....	68
Figure 31 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de la $\beta$ -caténine par la voie Wnt et le protéasome. ....	70
Figure 32 : Ligands de la superfamille TGF $\beta$ chez les mammifères et les modèles animaux.....	73
Figure 33 : Modèle d'activation de la voie canonique des Smads par les ligands TGF $\beta$ . ....	75
Figure 34 : Signalisation cellulaire de l'EMT. ....	76
Figure 35 : Multi-phosphorylation séquentielle de la protéine APC par les kinases CK1 et GSK3 $\beta$ .....	81
Figure 36 : Les facteurs de transcription au centre des programmes de l'EMT.....	87
Figure 37 : Répression et activation transcriptionnelle par les protéines SNAIL. ....	90
Figure 38 : Expression de la protéine SNAIL1 au cours de l'EMT type 1, 2 et 3.....	92
Figure 39 : Boucles de rétrocontrôle de l'activité de SNAIL1 au cours de l'EMT.....	94
Figure 40 : Organisation structurale des protéines SNAIL et SLUG.....	99
Figure 41 : Régulation post-traductionnelle de la stabilité, la localisation et l'activité de SNAIL1. ....	100
Figure 42 : Les sept familles du kinôme humain (dendrogramme).....	106
Figure 43 : Phosphorylation par les protéine-kinases et réversibilité par les phosphatases.....	107
Figure 44 : Structure cristallographique du domaine catalytique de la kinase MEK1. ....	108
Figure 45 : Structure cristallographique du dimère de sous-unités régulatrices CK2 $\beta$ . ....	113
Figure 46 : Structure tridimensionnelle de l'holoenzyme CK2 $\alpha_2\beta_2$ . ....	114
Figure 47 : Assemblages supramoléculaires de la protéine-kinase CK2 : ( $\alpha_2\beta_2$ ). ....	115
Figure 48 : Régulation de la reconnaissance des substrats par les sous-unités CK2 $\beta$ . ....	116
Figure 49 : Partenaires d'interaction de CK2 $\beta$ . ....	118
Figure 50 : Régulation de la signalisation de l'EMT : implication de la protéine-kinase CK2?.....	189
Figure 51 : Modèle de régulation du domaine SRD de SNAIL1 par les kinases CK1, CK2 et GSK3 $\beta$ . ....	191



# LISTE DES TABLEAUX

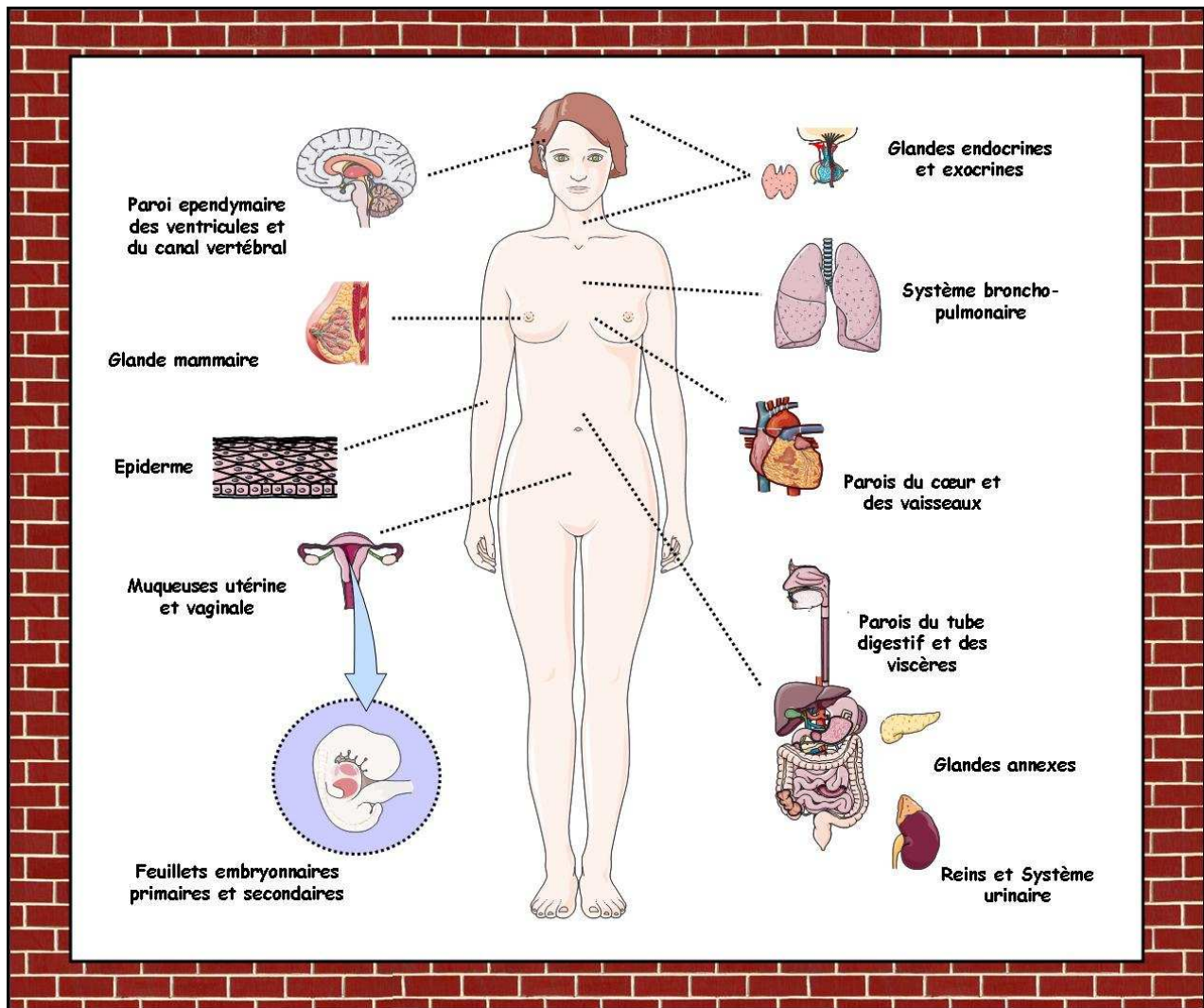
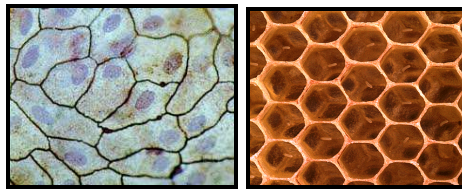
Tableau 1 : Protéines régulatrices du cytosquelette d'actine. ....	9
Tableau 2 : Cytokératines acides et basiques dans les tissus épithéliaux humains .....	15
Tableau 3 : Classification des cadhérines humaines. ....	20
Tableau 4 : Contextes embryonnaires et tissus dérivés de l'EMT de type 1.....	39
Tableau 5 : Bio-marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. ....	54
Tableau 6 : Conservation des isoformes des ligands Wnt.....	71

# ***Introduction***



## **CHAPITRE I : La cellule épithéliale, un « chef-d'œuvre de l'évolution »**

Les premières cellules (et donc par extension la vie telle qu'elle est définie aujourd'hui) sont probablement apparues il y a environ 3,5 milliards d'années sous forme d'un ARN répliquable, possédant une fonction enzymatique et entouré d'un assemblage de molécules lipidiques. La transmission du matériel génétique par l'intermédiaire d'un ADN double brin (beaucoup plus stable et facile à réparer) a par la suite donné naissance aux premières véritables cellules procaryotes. Ces cellules possédaient moins de 1000 gènes et ressemblaient très probablement aux mycoplasmes qui parasitent encore aujourd'hui les cultures de laboratoire. Deux milliards d'années avant notre ère, les cellules eucaryotes apparaissent avec un matériel génétique désormais protégé à l'intérieur d'un noyau en contact étroit avec des organites spécialisés et un cytosquelette leur conférant une morphologie spécialisée et une capacité de mouvement. Au cours de l'évolution, leur structure moléculaire s'est fortement complexifiée ; l'émergence d'une vaste classe de molécules d'adhérence a permis d'établir une communication chimique et mécanique entre deux cellules issues d'une même mitose, et donc l'apparition de la pluricellularité, aboutissant à la compartimentalisation et la sophistication des fonctions biologiques. La cellule épithéliale s'est probablement spécialisée très tôt chez les premiers métazoaires, comme en témoignent leurs descendants les plus proches tels que les éponges calcaires. Son «succès évolutif» est mis en évidence par le fait que cette cellule préhistorique a aujourd'hui conservé bon nombre de ses caractéristiques originelles malgré l'explosion de diversité qui a accompagné le développement des êtres vivants pluricellulaires. Dans l'organisme humain, elles représentent une part très importante du volume corporel et on les trouve dans tous les tissus recouvrant la surface externe (peau, muqueuses) et les cavités internes de l'organisme (tube digestif, vaisseaux...) où elles participent à de nombreuses fonctions telles que la protection, l'absorption ou la filtration. L'épithélium constitue également les glandes et assure les phénomènes de sécrétion et d'excrétion (dans le chapitre IV, nous nous intéresserons plus particulièrement au cas de l'épithélium mammaire). (*cf. figure 1*)



**Figure 1 : Localisation des cellules épithéliales dans l'organisme.**

Modifié à partir de (illustrations *Servier Medical Arts*)

Les cellules épithéliales sont à la base de l'architecture des organes chez tous les protozoaires. Ces cellules sont capables de s'associer pour former des macrostructures tissulaires grâce à une cohésion rappelant celles des alvéoles ou encore des assemblages architecturaux. Une telle comparaison est bien sûr très imagée car si les cellules épithéliales répondent à des contraintes mécaniques parfois similaires à ces «structures figées», elles ont en revanche développé des systèmes d'«échafaudage» extrêmement performants dotés de capacités d'assemblage et de désassemblage dynamiques. Les tissus épithéliaux sont présents dans tous les tissus recouvrant la surface externe et les cavités internes de l'organisme. Vers l'extérieur, il s'agit de la peau et des muqueuses ; à l'intérieur, ce sont les cavités des organes creux et les glandes. (source : J. AMICE, Université de Bretagne Occidentale, Brest)

## A. Organisation moléculaire des cellules épithéliales

L'architecture complexe des épithéliums trouve son origine dans la diversité des complexes moléculaires qui organisent la morphologie et la fonction des cellules épithéliales. Par définition, une cellule épithéliale est caractérisée par **(i)** une polarisation cellulaire apico-basale marquée par une localisation sélective des protéines d'adhésion le long de la membrane latérale ; **(ii)** une organisation corticale du cytosquelette d'actine et **(iii)** la présence de filaments intermédiaires de cytokératines ; **(iv)** enfin, les cellules épithéliales sont définies par leur interaction avec une membrane basale via des molécules d'adhérence spécifiques.[1]

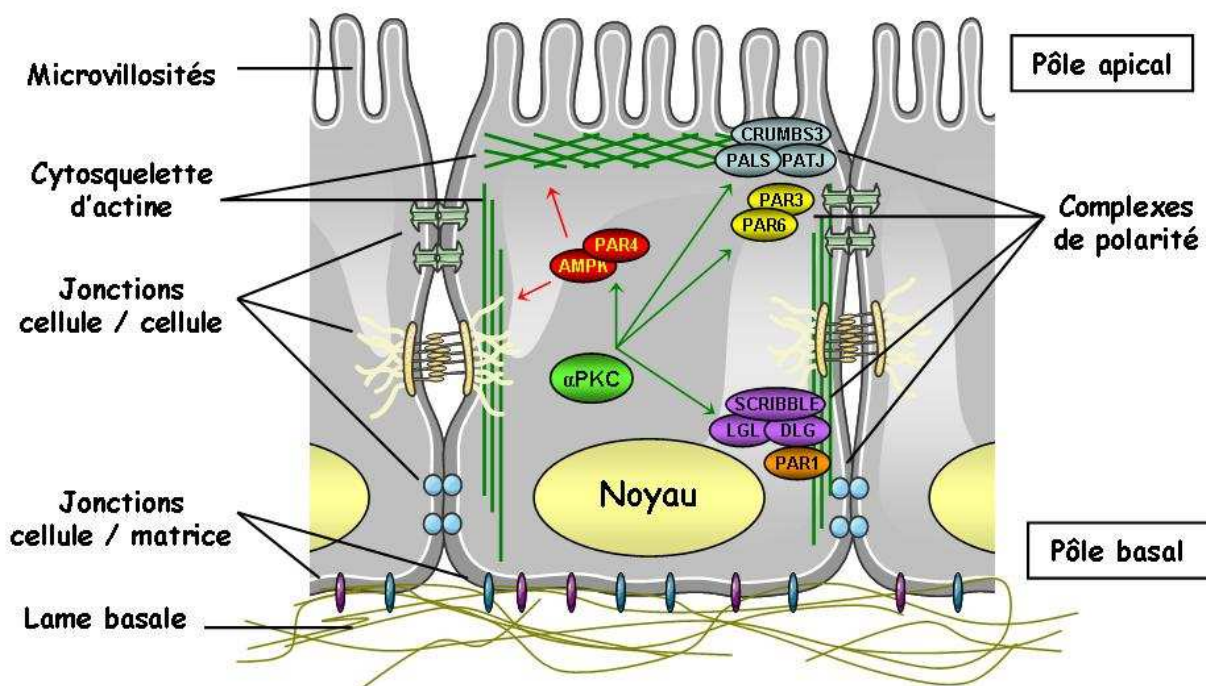
La capacité des cellules animales à générer et maintenir une distribution polarisée des composants de la surface cellulaire et des organites intracellulaires est capitale pour leur capacité à fonctionner en réseaux pluricellulaires. Pratiquement toutes les cellules possèdent un certain degré d'asymétrie et d'anisotropie moléculaire mais la polarité cellulaire est particulièrement démonstrative dans les cellules épithéliales. Leur surface membranaire est typiquement divisée en au moins deux domaines en continuité physique mais biochimiquement et fonctionnellement distincts : les domaines apical et basal (ou baso-latéral).[2]

Le **domaine apical** de la membrane plasmique, en regard de la lumière de l'organe (espace luminal) ou de l'environnement extérieur, est le domaine le plus spécialisé, car la surface apicale contient la plupart des protéines nécessaires aux fonctions spécifiques (digestion, absorption de nutriments, résorption). Ce domaine abrite également la plupart des récepteurs aux facteurs de croissance solubles et aux cytokines (EGF, TGF $\beta$ , insuline...) ainsi que les complexes adaptateurs péri-membranaires qui leur sont associés (protéines G, kinases et phosphatases, facteurs d'échange...). La structure de ce domaine est largement régulée par une série de protéines très conservées de la famille des « *PARtitionning defective proteins* » (protéines PAR) dont l'invalidation résulte en la perte de l'asymétrie cellulaire. Les protéines **PAR3** et **PAR6** co-localisent sélectivement au pôle apical avec la kinase  $\alpha$ PKC et s'associent aux jonctions serrées, au cytosquelette et à des récepteurs transmembranaires (TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII, ERBB2) pour les séquestrer dans la partie haute de la cellule.[3] Le complexe de stabilisation **CRUMBS/PALS1/PATJ** est activé par  $\alpha$ PKC/PAR3/PAR6 et permet la mise en place des jonctions intercellulaires dans la partie haute de la cellule. Ce complexe apical est également associé à **SMURF1**, une E3 ubiquitine-ligase qui sert d'adaptateur entre la signalisation extracellulaire et le système de régulation du cytosquelette d'actine.[3-5]

Le **domaine baso-latéral** abrite la plupart des protéines requises pour les processus cellulaires fondamentaux communs aux cellules polarisées et non-polarisées (noyau, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi...). Il est toutefois spécialisé dans les interactions avec les composants de la lame basale sous-jacente.[6] La membrane plasmique baso-latérale est parcourue de nombreuses protéines transmembranaires, les intégrines, retenues dans l'espace baso-latéral par des interactions multiples avec des éléments de la lame basale et des complexes adaptateurs. On trouve principalement des isoformes de **PAR1** (ce sont toutes des protéine-kinases associées aux microtubules) indispensables à l'assemblage des complexes intégrines / lame basale. Le complexe **hSCRIBBLE/hDLG/LGL** est typiquement retrouvé le long des faces latérales de la membrane plasmique et permet de coordonner l'assemblage du cytosquelette d'actine dans le domaine baso-

latéral. Son activation, comme pour CRUMBS/PALS1/PATJ, est sous le contrôle de la kinase  $\alpha$ PKC qui participe ainsi à la coordination des structures des deux domaines.[3, 7-8] Cette kinase active également la protéine **PAR4** (kinase LKB1), un régulateur positif de la serine/thréonine-kinase dépendante du 5'-AMP (AMPK : 5'-AMP activated Kinase). L'**AMPK** possède de nombreux substrats impliqués dans la perception du métabolisme (metabolic sensor) et la signalisation cellulaire. De plus, cette enzyme participe à la régulation du cytosquelette épithélial en contrôlant l'assemblage des filaments d'actine le long des parois latérales et du cortex apical, mais aussi à la polarisation des microtubules et le transport intracellulaire.[3, 9-11] (cf. figure 2)

La genèse et le maintien de ces deux domaines membranaires distincts impliquent le tri des molécules constituant la membrane plasmique. Les protéines apicales, comme les protéines baso-latérales, sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique granulaire et transportées dans le complexe de Golgi, puis sont finalement adressées vers les domaines opposés de la membrane plasmique. En parallèle, l'internalisation de composants membranaires par endocytose depuis la surface apicale jusqu'au pôle basal (processus de transcytose) génère un échange permanent entre les deux domaines. Le cytosquelette joue un rôle particulièrement important dans ces échanges en assurant le tri et l'adressage asymétrique des protéines vers l'ensemble de la cellule.[12-13]



**Figure 2 : Polarité apico-basale des cellules épithéliales.**

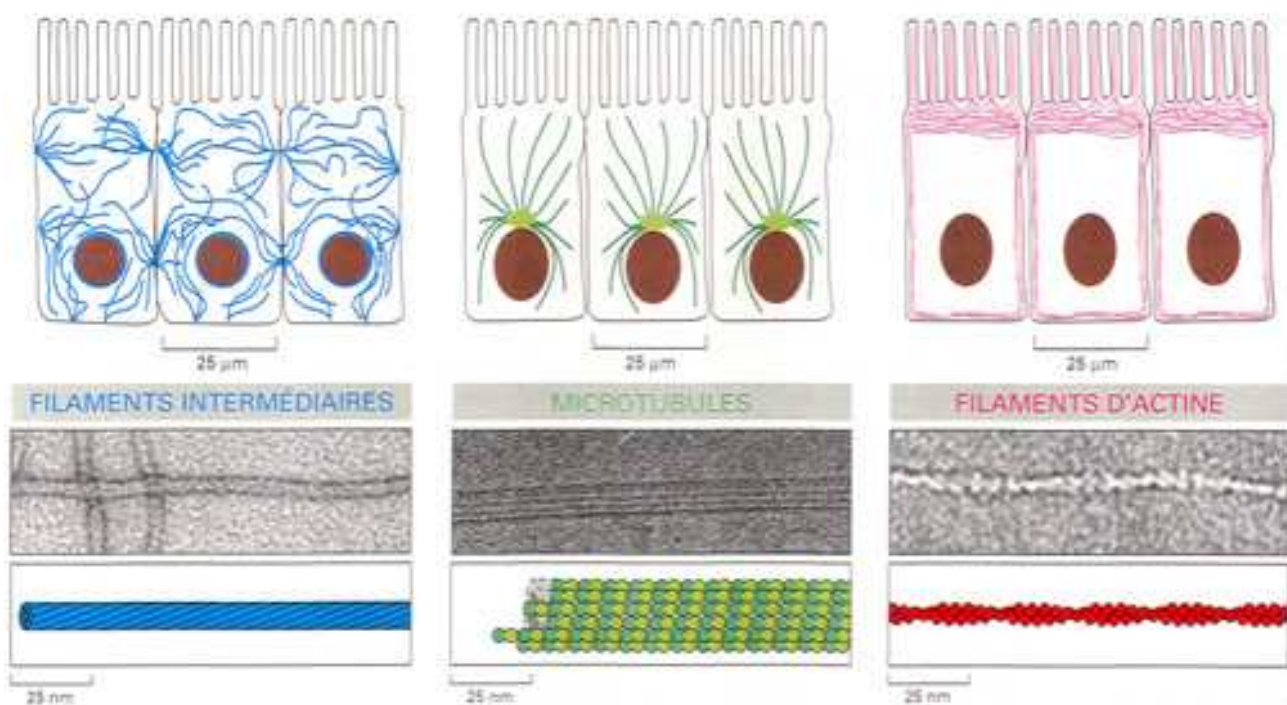
Modifié à partir de (Illustrations *Servier Medical Arts*) d'après (Tanos, B. & Rodriguez-Boulan, E. ; 2008) [3]

La cellule est polarisée le long de l'axe apico-basal : le noyau est séquestré dans le compartiment basal et on observe une répartition spécifique des jonctions intercellulaires et du cytosquelette. La protéine-kinase  $\alpha$ PKC joue un rôle central dans l'activation et la répartition asymétrique des complexes de polarité cellulaire : le complexe PAR3/6 est confiné dans la partie apicale avec les protéines CRUMBS3, PALS et PATJ ainsi que l'ubiquitine-ligase SMURF1. Au niveau baso-latéral, on trouve le complexe SCRIBBLE/DLG/LGL associé à PAR1 et PAR2.  $\alpha$ PKC active également les kinases LKB1 (PAR4) et AMPK qui régulent l'assemblage des microfilaments d'actine le long de la membrane plasmique dans les deux domaines.



## B. Le cytosquelette des cellules épithéliales

Le cytosquelette est un ensemble complexe de filaments et tubules protéiques présent dans toutes les cellules eucaryotes ; il constitue un échafaudage qui sert de squelette interne à la cellule et au tissu. Dans les cellules épithéliales, l'ensemble de ses composants forme un réseau continu grâce aux connexions établies par les jonctions intercellulaires. Il existe trois familles différentes de protéines du cytosquelette : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires de cytokératine et les microtubules. (*cf. figure 3*) Les rôles et fonctions de ces protéines sont différentes mais présentent plusieurs caractéristiques communes : ce sont toutes des structures dynamiques qui se réorganisent au cours de différents événements cellulaires (migration, division, séparation des chromosomes, mouvements des organites et des vésicules de sécrétion). Leur association directe à des protéines cytoplasmiques (moteurs moléculaires, protéines responsables de l'organisation spatiale des réseaux, protéines sous-membranaires...) et indirecte à des molécules d'adhérence leur confèrent des propriétés structurales et fonctionnelles spécifiques (ancrage, organisation spatiale, stabilité, consolidation, étirement, contraction, traction, transport intracellulaire...).[14]



**Figure 3 : Représentations schématiques et photographies microélectroniques du cytosquelette des cellules épithéliales.**

D'après (*Molecular Biology of the Cell, Alberts ; 2008*) [14]

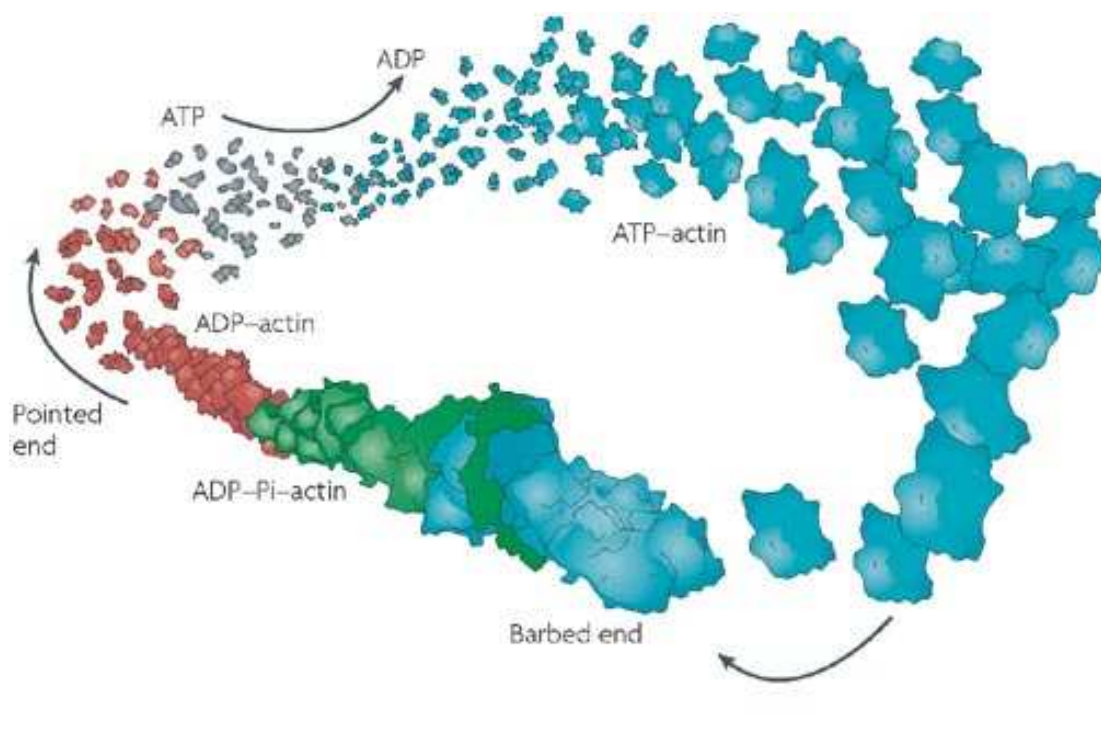
**(a)** Les filaments intermédiaires (FI) sont associés aux jonctions intercellulaires participent à la structuration des faces latérales de la membrane. **(b)** Les microtubules rayonnent distalement à partir des centrosomes pour permettre entre autres le transport de vésicules. **(c)** Le réseau d'actine s'associe à la membrane plasmique pour former le cortex cellulaire ; comme les FI, il est associé aux jonctions cellule-cellule et cellule-matrice.



## 1 - Les microfilaments d'actine

### 1.1. Organisation générale

Les microfilaments sont de longues fibres flexibles d'un diamètre d'environ 7 nm de diamètre, composés de deux chaînes protéiques entrelacées lâchement comme deux cordons de perles (*cf. figure 3*), chaque perle représentant une protéine globulaire, l'actine G. L'assemblage de ces structures est spontané en présence d'ATP (*in vitro* et *in vivo*) et se fait par polymérisation de molécules d'actine G au niveau des deux extrémités du filament en formation. Les filaments d'actine sont des structures polarisées arborant une croissance très rapide au pôle plus (environ 1000 monomères par seconde) et beaucoup plus lente au pôle moins.[15] Dans les cellules, la dépolymérisation se fait essentiellement au niveau du pôle moins qui s'effiloche en une extrémité pointue («pointed end») pour relarguer des monomères d'actine G. Au contraire, le pôle plus est alimenté par une croissance dynamique et son aspect est dit barbu («barbed end»). Cette dynamique des monomères qui passent d'un pôle à l'autre du filament comme sur «tapis roulant» correspond au phénomène de «treadmilling».[16] (*cf. figure 4*)



**Figure 4 : Dynamique des microfilaments d'actine.**

D'après (Pak, C.W. *et al.* ; 2008) [17]

*In vitro*, l'assemblage des microfilaments est spontané en présence d'ATP : la polymérisation des monomères d'actine G permet la formation de structures polarisées arborant une croissance très rapide et dynamique au pôle plus (environ 1000 monomères par seconde) et beaucoup plus lente au pôle moins. Dans les cellules, la dépolymérisation et le relargage des monomères d'actine G se fait principalement au niveau du pôle moins («pointed end») ; ces monomères alimentent la croissance au pôle plus («barbed end»). *In vivo*, le pôle plus peut également être sujet à des événements de dépolymérisation sous l'effet de protéines régulatrices (gelsoline, cofiline...).

Cette vitesse de polymérisation est régulée par de nombreuses protéines, les **ABP** (*Actin Binding Proteins*), qui fonctionnent comme des commutateurs, enclenchant le processus de polymérisation ou de dépolymérisation au moment approprié. *In vivo*, le centre de nucléation le plus efficace et le plus utilisé pour la synthèse rapide de microfilaments est le complexe **ARP2/3**. [18] Deux autres protéines de nucléation ont également été identifiées chez la drosophile et leurs fonctions semblent conservées chez les mammifères : la protéine Spire et les formines. [19-23] La polymérisation est aussi favorisée par la thymosine  $\beta 4$  et la profiline qui se fixent à l'actine monomérique liant l'ATP, favorisant ainsi l'intégration de l'actine G dans le polymère, la protéine **CapZ**, un dimère de deux sous-unités dont le rôle est au contraire de limiter la croissance rapide des microfilaments au pôle + afin de les stabiliser.

Enfin, on peut citer les protéines de destructuration rapide du réseau d'actine telles que la gelsoline, la séverine ou la cofiline. [24-25] (*cf. tableau 1*)

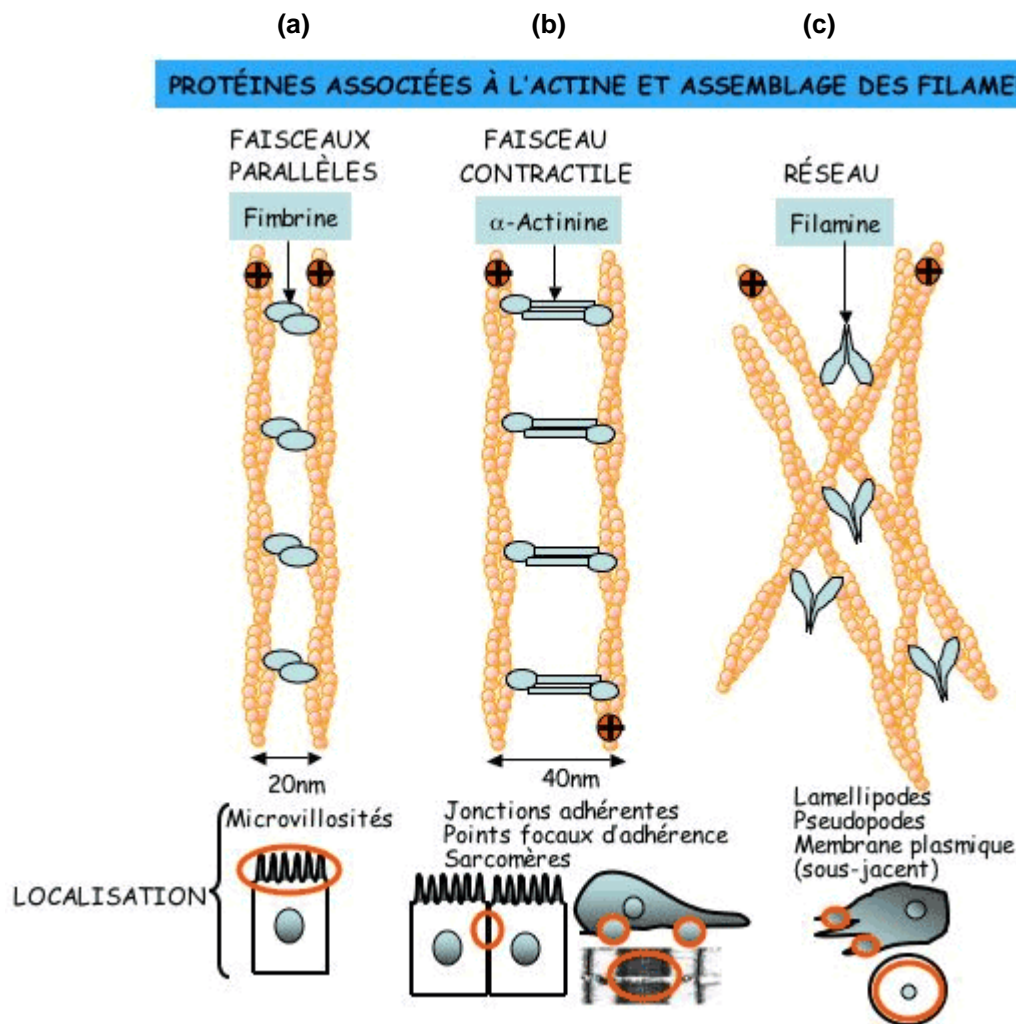
Protéine ABP	PM (kD)	Action sur l'actine
Cofiline	15	dépolymérisation du pôle (-)
Séverine	40	capping et coupure du pôle (+)
Gelsoline	87	capping et dissociation du pôle (+) / transition gel-sol
CapZ	36 ( $\alpha$ ) - 32 ( $\beta$ )	capping pôle (+), stabilisation
Thymosine $\beta 4$	5	séquestration des monomères et Polymérisation du pôle (+)
Profiline	15	séquestration des monomères et Polymérisation du pôle (+)
Tropomoduline	40	capping pôle (-)
Arp 2/3	200	capping pôle (-) et nucléation
Formines	variable	capping pôle (-), nucléation, interaction avec les microtubules
Spire	variable	capping pôle (-) et nucléation

**Tableau 1 : Protéines régulatrices du cytosquelette d'actine.**

Les monomères d'actine G existent sous 7 isoformes différentes dans le génome des mammifères avec trois types de spécialisation fonctionnelle : l'**actine alpha** est capable de lier les myosines et existe sous 4 isoformes présentes dans les muscles striés squelettiques, le myocarde et les muscles lisses des parois des organes internes et des vaisseaux. Cette dernière isoforme (l'actine du muscle lisse :  $\alpha$ -SMA, *Smooth Muscle Actin*) est également exprimée au cours de la migration cellulaire pour constituer les fibres contractiles. Il n'existe qu'une isoforme de l'**actine beta** (non musculaire), celle-ci est exprimée dans toutes les cellules pour former les faisceaux parallèles et les réseaux en mailles qui déterminent la morphologie et l'architecture cellulaire. Finalement, les deux isoformes d'**actine gamma** sont présentes majoritairement dans le muscle lisse entérique et les tissus non musculaires mais elles sont exprimées à faible concentration dans tous les types cellulaires et semblent jouer le même rôle que l'actine beta. [26-27]

## 1.2. Macrostructures et réseaux d'actine

Dans les cellules épithéliales, le réseau de microfilaments est localisé essentiellement au niveau du cortex, c'est-à-dire la zone sous-jacente à la membrane plasmique. Cette actine corticale est fortement polarisée avec une organisation macrostructurale distincte dans les compartiments apical et baso-latéral : au niveau basal, le réseau d'actine se présente principalement sous forme de mailles avec des filaments lâches interconnectés de façon orthogonale par la **filamine**. Ce type de réseau «en mailles» est également retrouvé dans des structures membranaires transitoires impliquées dans la motilité cellulaire telles que les lamellipodes (*cf. chapitre III*). Les microvillosités sont des structures apicales spécifiques des épithéliums présentant des fonctions d'absorption des gaz ou des nutriments (alvéoles pulmonaire, intestin grêle...), elles sont formées de faisceaux d'actine parallèles liées à la **fimbrine** ou la villine (protéine spécifique des microvillosités). Ces protéines orientent les filaments avec la même polarité et les séparent par un espace de 20 nm.[28]



**Figure 5 : Représentation schématique des différents réseaux d'actine existant dans les cellules épithéliales.**

Modifié d'après (*Science bio*)

(a) Les molécules de fimbrine relient les filaments de façon parallèle avec la même polarité en les séparant par un espace de 20 nm (actine corticale apicale). (b) L'α-actinine établit des faisceaux dans lesquels les filaments ont des polarités opposées et sont espacés de 40 nm. (c) La filamine croise les microfilaments pour permettre la formation d'un réseau en mailles.

Dans le pôle basal, le réseau d'actine qui tapisse la membrane des parois latérales forme au contraire des fibres assemblées en fagots («actin bundles»).[29-30] Dans ces structures, on trouve des fibres parallèles autour de dimères de fimbrine mais surtout des associations antiparallèles de microfilaments sous l'effet de l' **$\alpha$ -actinine** (cette protéine dimérise et sépare des filaments de polarités opposées par un espace de 40 nm). (cf. *figure 5*) Les fagots d'actine peuvent être associés à des moteurs moléculaires (myosines) capables de déclencher leur contraction. Cette organisation particulière est surtout caractéristique des faisceaux contractiles présents dans les sarcomères des cellules musculaires et les fibres de stress des cellules fibroblastiques en migration (cf. *chapitre III*) mais on la retrouve dans certains épithéliums, en particulier dans les cellules myoépithéliales. Ces faisceaux contractiles sont aussi présents dans la ceinture d'adhérence ou encore l'anneau contractile mitotique qui permet la cytodierèse en fin de division cellulaire.[31-32] Pour finir, il existe de nombreuses protéines capables de connecter les deux réseaux de microfilaments entre eux (mailles et fagots) ; on peut citer par exemple la spectrine qui joue un rôle déterminant dans le maintien des microvillosités de l'épithélium intestinal.[33]

### 1.3. Régulation : la famille des Rho GTPases

L'organisation du réseau d'actine en mailles ou en fibres est contrôlée par de petites protéines régulatrices de la famille Rho, un sous-ensemble de la superfamille des petites **GTPases Ras**. Les plus connues sont Rho (RhoA), Rac (Rac1) et Cdc42 ; toutes ces protéines existent sous une forme active liée au GTP et une forme inactive qui fixe le GDP.[34] Le passage d'une forme à l'autre se fait par l'intervention de protéines spécifiques, les **RhoGEFs** (*Guanine nucleotide Exchange Factors*), permettant la liaison du GTP et les **RhoGAPs** (*GTPases Activating Proteins*) favorisant le retour à l'état inactif. Cette famille de protéines a été largement étudiée pour son impact sur le remodelage des fibres d'actine permettant d'aboutir à des phénotypes migratoires mais leur rôle est également déterminant dans les processus qui permettent de définir la morphologie cellulaire et l'architecture complexe des épithéliums.[35-36]

Dans les cellules épithéliales, une activation locale de **Rac1** est responsable de la formation du réseau en mailles par l'intermédiaire d'une association avec la **kinase LIM** (LIMK : *Kinase spécifique des protéines à domaine LIM*). Cette association permet une phosphorylation activatrice de la **cofiline** (ADF : *Actin Depolymerizing Factor*), une protéine de «capping» favorisant la dépolymérisation. Cette dépolymérisation est nécessaire pour assurer un «turn-over» rapide des monomères d'actine G et donc un assemblage rapide du maillage en un réseau complexe ancré à la membrane plasmique.[5]

**Cdc42** permet la nucléation de filaments d'actine intervenant dans la formation de faisceaux parallèles par l'activation de la protéine **WASP**, produit du gène du syndrome de Wiskott-Aldrich (déficience de l'immunité caractérisée par un défaut de signalisation des lymphocytes B et T). WASP va interagir avec le complexe protéique nucléateur **Arp 2/3** pour l'activer, ceci provoquant une augmentation de la nucléation de filaments d'actine parallèles qui se structurent autour de la fimbrine au fur et à mesure de leur synthèse.[37]

Enfin, **RhoA** est responsable la formation des fagots d'actine qui structurent la membrane latérale des cellules épithéliales ou les faisceaux contractiles assemblés au cours de la migration cellulaire ou de la cytodierèse. RhoA est en effet un activateur de la kinase ROCK (*Rho associated protein Kinase*) qui régule

la conformation des molécules de myosine en agissant sur la phosphatase **MLCP** et la kinase **MLCK**. La forme active de **ROCK** est également inductrice de la phosphorylation de la cofiline par la **kinase LIM** et donc de la dépolymérisation locale du cytosquelette d'actine.[38-40] De manière extrêmement spécifique et locale, les GTPases Rho sont elles-mêmes sous le contrôle de nombreuses voies de signalisation impliquant en particulier des interactions avec les protéines PAR et des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation ( $\alpha$ PKC, Src...) ou ubiquitination (SMURFs). Dans les cellules épithéliales, l'ubiquitine-ligase SMURF1 est ainsi spécifiquement inhibée par PAR6 au niveau des faces latérales pour empêcher la dégradation de RhoA par le protéasome et donc l'effondrement des fagots d'actine.[5, 41-42]

## 2 - Les microtubules

### 2.1. Dynamique et régulation

Les microtubules sont formés de 13 protofilaments protéiques linéaires disposés en couronne pour constituer un tube creux d'un diamètre d'environ 25 nanomètres. Ils prennent naissance au niveau de centres de nucléation situés dans la région centrale de la cellule, d'où ils irradient vers la périphérie. L'unité de base des protofilaments est une protéine hétérodimérique, la tubuline, composée d'une sous-unité d' $\alpha$ -tubuline et une autre de  $\beta$ -tubuline. Ces deux protéines sont de petites GTPases parmi les plus conservées depuis l'apparition des premières cellules eucaryotes.[14] Comme les filaments d'actine, les microtubules sont polarisés et sont en constant état dynamique entre polymérisation (pôle plus) et dépolymérisation (pôle moins). Sous l'effet du phénomène de «treadmilling», on observe un roulement permanent entre les dimères des bouts plus et moins : la demi-vie moyenne *in vitro* d'un microtubule varie de 20 secondes à 10 minutes. Dans les cellules, la nucléation des microtubules est assurée par le centre organisateur **MTOC** (*MicroTubule Organizing Center*), organisé autour d'un macrocomplexe moléculaire appelé centrosome. Un complexe de  $\gamma$ -tubuline ( $\gamma$ -TURC) présent dans le MTOC initie la nucléation des filaments au bout moins et les coiffe pour les stabiliser.[43]

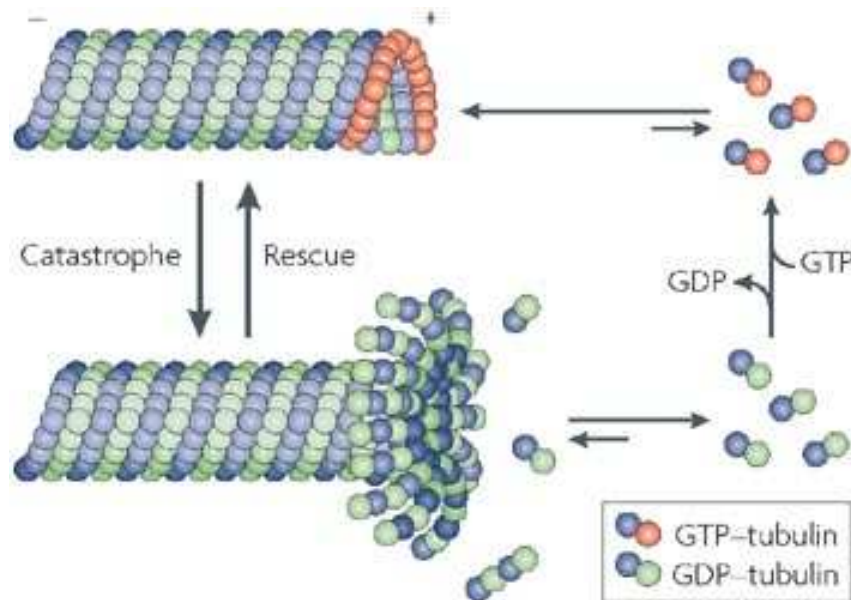
Des protéines **MAP** (*Microtubule Associated Protein*) peuvent, selon les types cellulaires, exercer une stabilisation des microtubules en des zones précises du cytoplasme ; elles sont particulièrement actives dans les cellules épithéliales et les neurones.[44] Ces protéines peuvent également fixer les microtubules au niveau de la membrane plasmique et interagir avec des molécules adaptatrices en contact avec le réseau d'actine ou les jonctions intercellulaires. Pour finir, des événements de «catastrophe», au cours desquels le filament se dépolymérise très rapidement, alternent avec les phases de croissance lente («sauvetage»). Ces instabilités sont dues à la présence d'une couronne de tubuline-GTP au bout moins qui est déstabilisée par l'hydrolyse des monomères GTP en tubuline-GDP. Cette dépolymérisation est favorisée par d'autres MAPs telles que la catastrophine, la katanine ou la stathmine.[14] (*cf. figure 6*) Des modifications post-traductionnelles peuvent également moduler la rigidité ou la stabilité des MTs (acétylation, détyrosination...)

Dans la cellule, le réseau microtubulaire intervient essentiellement dans les mouvements chromosomiques au cours du cycle cellulaire mais il est également responsable du mouvement de matériaux à l'intérieur du cytoplasme. Il peut en effet constituer de véritables rails, sur lesquels des moteurs moléculaires (kinésine,

dynéine) sont capables de se déplacer pour transporter des vésicules ou des organites. De plus, ils sont fortement impliqués dans l'acquisition et le maintien de la morphologie cellulaire et dans la facilitation des mouvements sur un support adhérent.[6, 45]

## 2.2. Interactions des microtubules avec le réseau d'actine

Les microtubules, contrairement aux microfilaments d'actine et aux filaments intermédiaires de kératine, ne sont pas ancrés directement aux jonctions intercellulaires. Cependant, de nombreuses études ont rapporté l'existence de protéines de liaison entre le réseau de microtubules et les mailles d'actine corticale, permettant ainsi un contact indirect et une «communication mécanique» entre les différents centrosomes. Un lien physique entre le cortex et le bout positif des microtubules astraux pourrait ainsi contrôler mécaniquement la position des centrosomes et jouer un rôle essentiel dans l'assemblage du fuseau central lors de la division cellulaire.[46-47] Ces interactions sont essentiellement médiées par les petites GTPases rho et semblent jouer un rôle déterminant dans la polarité cellulaire. Par exemple, la dépolymérisation des microtubules active RhoA et leur assemblage active Rac1.[48] Rac1 et Cdc42 agissent également en synergie pour activer **IQGAP1** et **APC**, deux protéines capables de guider et stabiliser les microtubules au niveau des jonctions adhérentes.[49] Il existe également une boucle de rétroaction positive entre les GTPases et les microtubules : Rho active la formine mDia, ce qui déstabilise les protofilaments et favorise donc l'activation de RhoA. Symétriquement, Rac active la kinase Pak1 qui stimule la croissance des microtubules.[44, 50-51] Les microtubules sont également capables d'interagir de façon dynamique avec les filaments intermédiaires via une liaison avec des protéines desmosomales de la plectine.[52] (*cf. partie D*)



**Figure 6 : Dynamique d'assemblage des microtubules.**

D'après (Cheeseman, I.M. & Desai, A. ; 2008) [45]

L'assemblage des hétérodimères de tubuline  $\alpha/\beta$  en microtubules est sous le contrôle du GTP et des protéines MAP (Microtubule Associated Proteins) qui sont capables de les stabiliser ou les déstabiliser. Comme dans le cas de l'actine, on observe un phénomène de «treadmilling» *in vitro*. Dans les cellules, le bout moins des microtubules est stabilisé par les centrosomes, ce qui limite l'incorporation ou la perte de nouvelles molécules de tubuline et donc la dynamique d'assemblage. La croissance du bout moins est en équilibre instable permanent entre des événements de catastrophe et de sauvetage (*rescue*).

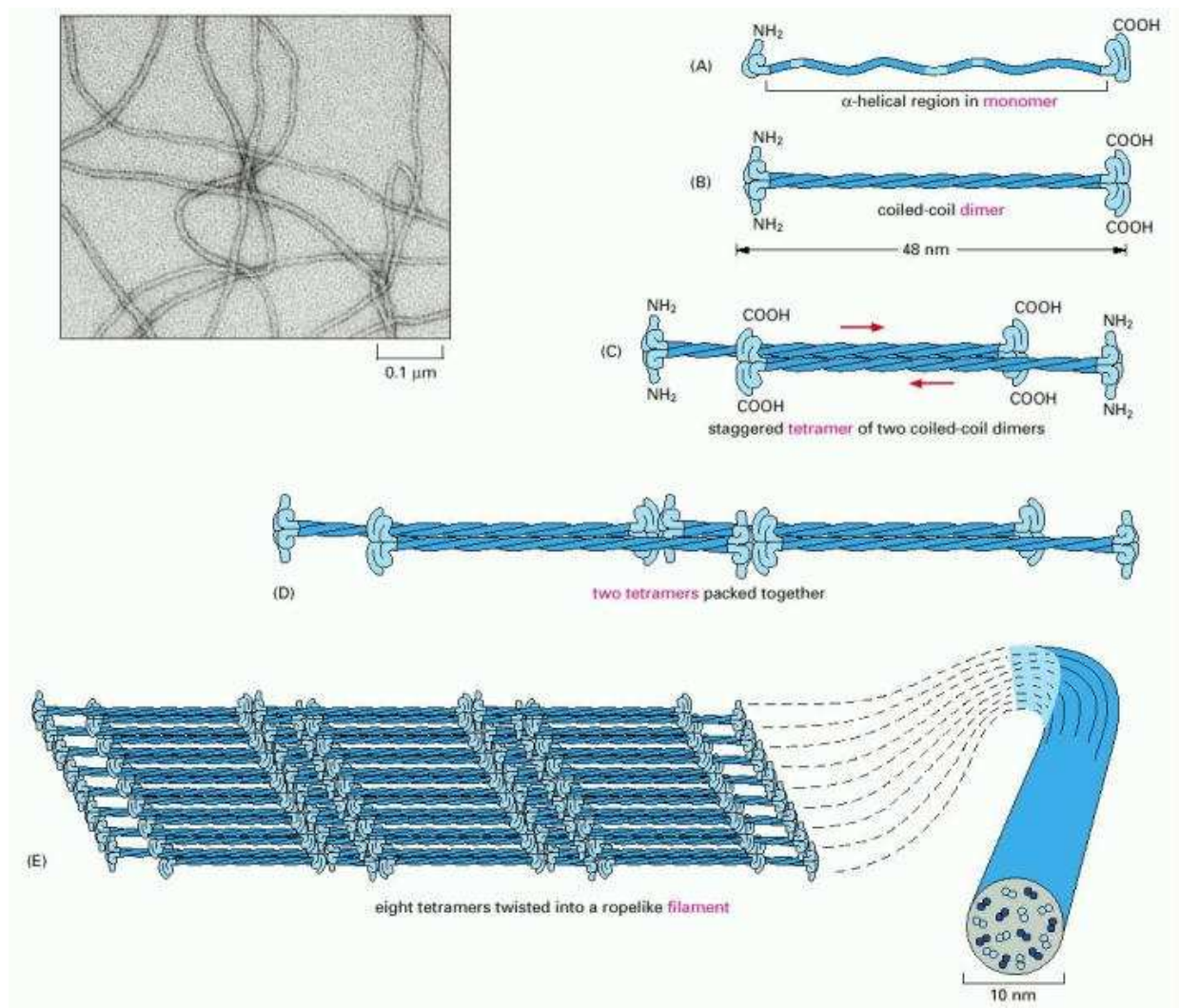
### 3 - Les filaments intermédiaires

Ce sont les composants les plus stables du cytosquelette des cellules animales ; ils sont constitués de protéines fibreuses résistantes, entrelacées selon un système d'imbrication caractéristique. Les structures qu'ils constituent ont un diamètre de 8 à 10 nanomètres, situé entre celui des microfilaments et celui des microtubules, d'où leur dénomination de filaments intermédiaires. Les filaments intermédiaires (appelés aussi **tonofilaments** ou IFs : Intermediate Filaments) constituent un groupe hétérogène de fibres spécialisées dont l'expression est variable selon le type cellulaire. Dans les cellules épithéliales humaines, les filaments intermédiaires sont constitués par des polymères de kératine (ou **cytokératine**), une famille de protéines dont le pattern d'expression est spécifique du type d'épithélium et de l'organe dans lequel il est situé. La synthèse des cytokératines dans les tissus épithéliaux pluristratifiés est également dépendante de son état de différenciation ou encore de la position des cellules dans les couches superficielles ou profondes.[53-54]

Tous les épithéliums, qu'ils soient ou non kératinisés, contiennent des filaments intermédiaires de cytokératine. Les cellules épithéliales sont normalement dépourvues des filaments intermédiaires caractéristiques des autres types cellulaires (desmine, protéines GFAP, NF...) ; la **vimentine** est cependant physiologiquement exprimée dans plusieurs épithéliums et on trouve des filaments intermédiaires de **lamine** à l'intérieur du noyau de toutes les cellules eucaryotes.[55] Une cytokératine atypique est la protéine codée par le gène *KRT19*, une petite kératine acide incapable de se complexer avec une isoforme basique mais interagissant avec la kératohyaline. Cette protéine ne forme pas de tonofilaments, on la retrouve essentiellement accumulée dans les cellules en cours de desquamation au niveau de la couche superficielle de l'épiderme (périderme) ; elle peut être produite par certaines cellules tumorales circulantes.[53, 56] Pour finir, il existe d'autres kératines particulières capables de remplir le cytoplasme de cellules rigides spécialisées : on peut citer les exokératines ( $\beta$ -kératines, «hair-keratins») qui structurent les ongles et les poils des mammifères ainsi que les écailles des poissons, amphibiens et reptiles ; la fibroïne est également une kératine et compose la soie sécrétée par les larves tisserandes et les arachnides.

L'unité de base du tonofilament est un hétérodimère formé d'une cytokératine **basique** (type II : KRT1 à 8) et une autre **acide** (type I : KRT 9 à 23). Ces dimères s'attachent ensuite de façon antiparallèle en tétramères qui s'assemblent en tubes complexes pour former des fibres stables ne se dissocient que très peu (*cf. figure 7 + tableau 2*). Plusieurs études ont toutefois mis en évidence une certaine dynamique de polymérisation / dépolymérisation dans les filaments intermédiaires, en particulier pour les lamines qui structurent et déstructurent l'enveloppe nucléaire des cellules en mitose.[57] Les filaments de kératine forment une cage autour des noyaux et se ramifient dans le cytoplasme pour s'attacher aux desmosomes (jonctions cellule-cellule) et aux hémidesmosomes (jonctions cellule-matrice). Ainsi, les filaments intermédiaires de deux cellules adjacentes sont en contact indirect, ce qui favorise la cohésion au sein des tissus épithéliaux.[58] De même que les microtubules et les filaments d'actine, les tonofilaments interagissent avec des protéines à leurs extrémités : les **IFAPs** (*Intermediate Filaments Associated Proteins*). Les IFAPs représentent une grande famille très hétérogène, la plus connue étant la plectine (ou Large CytoLinker), une protéine de 300 kD appartenant à la famille des desmoplakines (elle assure la fixation des tonofilaments avec la membrane plasmique au niveau des desmosomes).[59-60]





**Figure 7 : Représentation schématique et photographie microélectronique des filaments intermédiaires de cytokeratine.**

D'après (Molecular Biology of the Cell, *Alberts* ; 2008) [14]

L'unité de base du tonofilament est un hétérodimère formé d'une cytokeratine basique et une autre acide. Ces dimères s'assemblent ensuite de façon antiparallèle en tétramères qui s'attachent en tubes complexes pour former des fibres très stables de 8 à 10 nanomètres de diamètre. Les kératines acides et basiques représentent une famille de vingt protéines dont le pattern d'expression est spécifique du type d'épithélium et de son état de différenciation.

Cytokératines		Localisation principale
Acides (type I)	Basiques (type II)	
KRT9, KRT10	KRT1, KRT2	Stratum corneum, Kératinocytes
KRT12	KRT3	Cornée
KRT13	KRT4	Epithéliums stratifiés
KRT14, KRT15	KRT5	Epithéliums stratifiés
KRT16, KRT17	KRT6	Epithéliums squameux
KRT18, KRT20	KRT7	Epithéliums simples et tubulaires
KRT18, KRT20	KRT8	Epithéliums simples
KRT19		Epiderme (périderme)

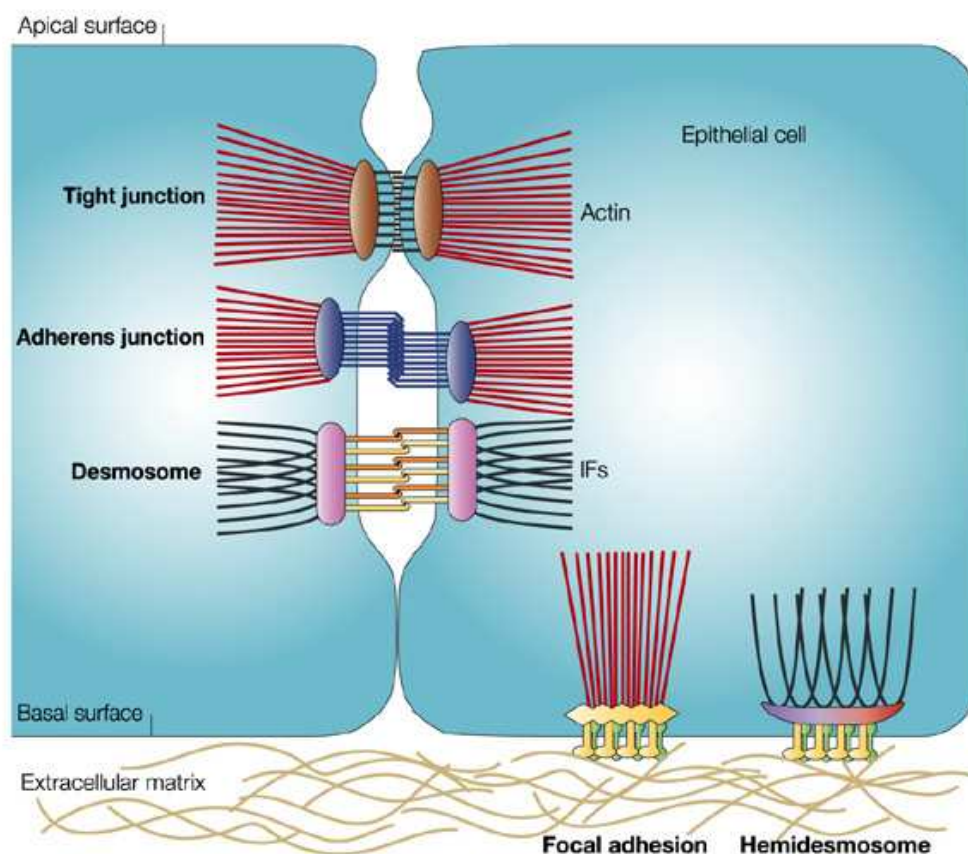
**Tableau 2 : Cytokératines acides et basiques dans les tissus épithéliaux humains**



### C. Les complexes jonctionnels intercellulaires

La cohésion des tissus épithéliaux dépend essentiellement de trois types de jonctions d'adhérence intercellulaires : les jonctions serrées (ou «zonula occludens»), les jonctions adhérentes (ou «zonula adherens») et les desmosomes (*cf. figures 2, 3 et 8*). Bien que chaque type de jonction possède son propre mécanisme de formation, de régulation et de fonctionnement, une importante communication existe entre les différents systèmes et influence mutuellement leur dynamisme et leurs propriétés de signalisation. D'une manière générale, toutes ces jonctions présentent un schéma d'organisation similaire avec des protéines transmembranaires permettant l'interaction de deux cellules par leur domaine extracellulaire ; le domaine cytosolique est attaché à des protéines adaptatrices qui assurent un lien avec le cytosquelette. (*cf. figure 8*)

Ainsi, les molécules d'adhésion se comportent à la fois comme des cibles des signaux générés à l'intérieur de la cellule («inside-out signalling») et comme des récepteurs à partir desquels des signaux intracellulaires sont émis («outside-in signalling»), du fait des interactions homotypiques entre les cellules voisines.[61]



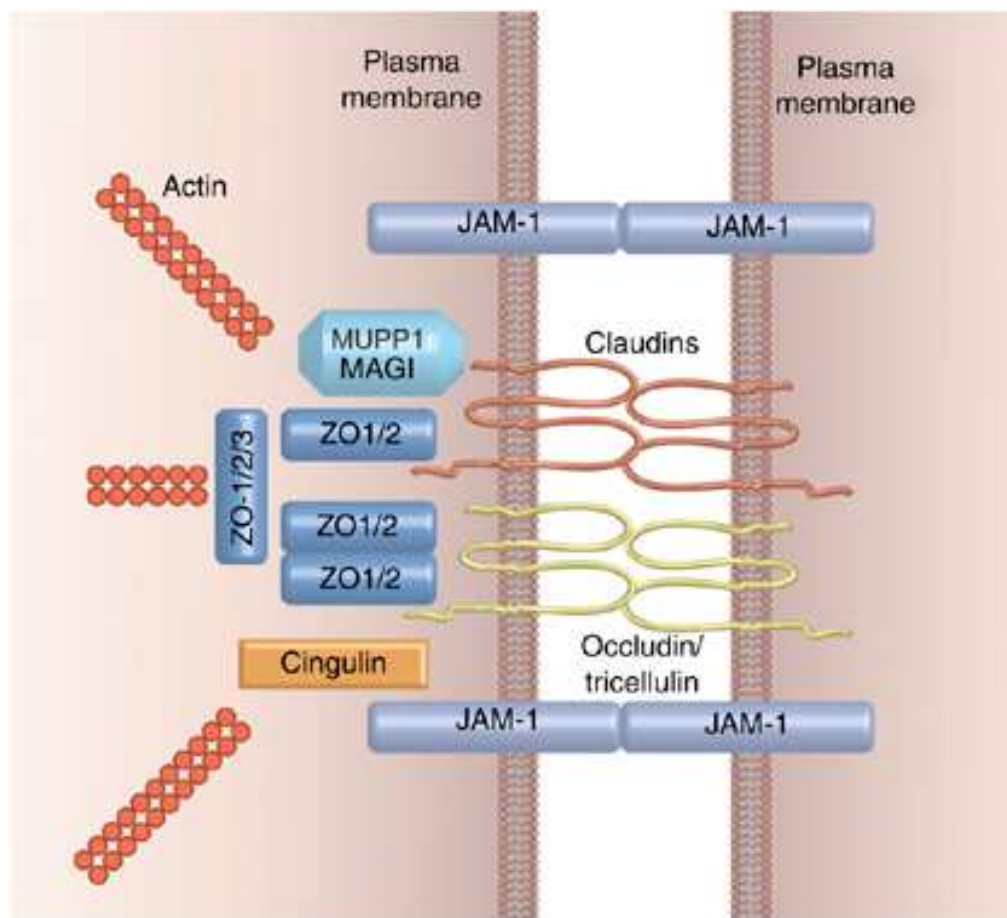
**Figure 8 : Représentation schématique des complexes jonctionnels dans les cellules épithéliales.**

D'après (Jefferson, J.J. *et al.* ; 2004) [62]

Les complexes d'adhésion sont très abondants dans les tissus épithéliaux et participent à la délimitation des domaines apical et baso-latéral. Toutes ces jonctions présentent une organisation structurale commune avec des protéines transmembranaires interagissant par dimérisation des domaines extracellulaires et reliées au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines adaptatrices sous-membranaires. Sur la figure, on peut voir deux grands types de jonctions : les jonctions intercellulaires (*tight junctions*, *adherens junctions* et *desmosomes*) et les jonctions cellule-matrice (*focal adhesions* et *hémidesmosomes*).

## 1 - Les jonctions serrées (TJs :Tight Junctions)

Ce sont des régions membranaires où vont fusionner les feuilletts externes des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes pour assurer l'étanchéité de la barrière épithéliale. Elles obturent les espaces intercellulaires de sorte que ce qui est contenu dans la lumière ne puisse pénétrer entre les cellules (et à l'intérieur). Les jonctions serrées forment une bandelette continue tout autour de la cellule : c'est la **zonula occludens** (ceinture d'occlusion). Elles sont à l'origine de la fonction de barrière des épithéliums par leur capacité à contrôler le transit moléculaire entre les cellules. La zonula occludens entoure complètement les faces latérales des cellules épithéliales près de leur pôle apical, séparant les lipides en deux compartiments pour délimiter les pôles apical et basal de la membrane plasmique.[63]



**Figure 9 : Structure moléculaire des jonctions serrées.**  
D'après (Niessen, M. *et al.* ; 2007) [64]

Les jonctions serrées sont à l'origine de la fonction de barrière des épithéliums grâce à des protéines à plusieurs passages transmembranaires (occludine, JAM, claudines) connectées au réseau d'actine apical par les protéines de la zonula occludens (ZO1, 2, 3). Cet ensemble constitue un anneau périjonctionnel relié à des molécules de myosines permettant sa contraction en cas de déformation mécanique.

Au niveau moléculaire, les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires (occludine, JAM, claudines) connectées au réseau d'actine apical par les protéines de la **zonula occludens** (ZO1, 2, 3). Cet ensemble constitue un anneau périjonctionnel relié à des molécules de myosine permettant sa contraction en cas de déformation mécanique. (*cf. figure 9*)

Les **claudines** sont une famille d'isoformes dont le pattern d'expression est dépendant du type de tissu épithélial. Ce sont de petites protéines à 4 domaines transmembranaires (20-27 kD) qui interagissent de façon homophile dans l'espace intermembranaire. La claudine la plus exprimée dans les tissus épithéliaux est la claudine 1 dont le rôle est décisif en particulier au niveau de l'épiderme. (Les souris invalidées pour le gène codant cette protéine montrent des défauts de perméabilité des jonctions serrées et meurent de déshydratation dans les heures suivant la naissance).[65] Les claudines sont associées aux occludines et à la protéine **JAM1** (*Junctional Adhesion Molecule-1*), un membre de la famille des IgCAMs (*Immunoglobuline like Cell Adhesion Molecules*), ne possède qu'un seul passage à travers la membrane plasmique et un long domaine extracellulaire assurant également une liaison homotypique. Tous ces contacts sont dépendants du calcium et très sensibles à la digestion par la trypsine (les domaines extracellulaires sont détruits et les protéines doivent être ré exprimées de novo).[66]

## 2 - Les jonctions adhérentes (AJs : Adherens junctions)

Les jonctions adhérentes mettent en relation les faisceaux de microfilaments d'actine contenus dans le cytoplasme de deux cellules voisines.[67] Dans les tissus non-épithéliaux, elles vont former des jonctions éparses ou bien des spots circulaires localisés appelés **macula adherens**. Au contraire, dans les épithéliums, elles forment une ceinture d'adhérence appelée **zonula adherens**. Au niveau moléculaire, les jonctions adhérentes sont constituées de la E-cadhérine comme protéine transmembranaire, reliée au cytosquelette d'actine via des protéines adaptatrices, principalement les caténines.[68-69] (*cf. figure 10*)

### 2.1. La superfamille des cadhérines

Les cadhérines constituent une large superfamille de protéines d'adhésion cellulaire calcium-dépendantes, initialement décrites comme sensibles à la dégradation trypsique, bien que résistantes à cette protéolyse en présence de calcium.[70] Les membres de ce groupe sont caractérisés par un unique domaine extracellulaire (domaine EC ou ectodomaine) dont la séquence est une répétition (entre 5 et 34) de motifs formés d'une centaine d'acides aminés hautement conservés. Ces motifs «Ig-like» (*Immunoglobuline-like*) présentent une affinité élevée pour les cations divalents et le calcium extracellulaire conditionne leur structure tertiaire et quaternaire ainsi que leur aspect fonctionnel. Les cadhérines peuvent être séparées en plusieurs sous-groupes en fonction de la séquence et la structure du domaine EC.[71] (*cf. tableau 3*)

Le sous-groupe le plus largement étudié à ce jour est celui des **cadhérines classiques** exprimées dans presque tous les tissus solides de l'organisme sous différentes isoformes. Il en existe deux types qui diffèrent par de subtiles différences dans la séquence protéique de leur domaine EC.

- Les **cadhérines de type I** (*CDH1*, 2, 3, 4 + *CDH15*) possèdent un domaine EC1 contenant une séquence CAR (*Cell Adhesion Recognition*) de 3 résidus His-Ala-Val (HAV), indispensables à l'établissement de contacts intercellulaires fonctionnels.[72] Les cinq membres du type I possèdent un domaine intracellulaire très semblable développant le même type d'interaction avec les adaptateurs moléculaires des jonctions adhérentes, essentiellement les caténines. Cette conservation les distingue des cadhérines **de type II** regroupant des protéines dont la structure du domaine cytosolique est très hétérogène (ancres GPI, domaine SH2, SH3....), contrairement à celle du domaine EC2 (celui-ci diffère du domaine EC1 par l'absence de séquence HAV).[73-74] Les cadhérines de type II sont essentiellement les produits des gènes *CDH5* à *12* ; d'autres membres de ce groupe ont plus récemment été identifiés. (*cf. tableau 3*) En pratique, la désignation des cadhérines classiques est principalement basée sur le nom du tissu dans lequel elles sont le plus largement exprimées ou simplement celui dans lequel elles ont été découvertes. Une telle nomenclature crée parfois des confusions sur la fonction cellulaire de ces protéines, d'autant que leur expression est variable d'un organisme à l'autre. En effet, la P-cadhérine (cadhérine Placentaire), nommée ainsi du fait de son identification dans le placenta murin, n'est pas retrouvée dans le tissu placentaire humain mais participe aux contacts de certaines cellules de la glande mammaire et est exprimée dans plusieurs modèles de tumeurs.[75-76] De même, l'expression de la N-cadhérine n'est pas non plus limitée au système nerveux, on la retrouve à des niveaux importants dans certains tissus conjonctifs.[68]

- Un autre type de cadhérines classiques sont les **cadhérines desmosomales** (desmoglénines et desmocollines) qui lient le cytosquelette de cytokératine et participent à l'assemblage des desmosomes. Bien que présentant un ectodomaine classique, ces protéines possèdent un domaine intracellulaire très différent de celui des cadhérines de type I et II, générant ainsi une transduction du signal spécifique. (*cf. chapitres III et IV*) Les autres membres des cadhérines classiques identifiés sont formés d'un domaine EC1-like avec une partie cytoplasmique très courte ou absente, c'est le cas des produits des gènes *CDH13*, 16 et 17).[77-78]

- Enfin, les **cadhérines non classiques** sont représentées par les protocadhérines (PCDHs) sous forme de nombreux produits d'épissage alternatif qui participent surtout à la mise en place des synapses neuronales. Des études génomiques chez la drosophile ont aussi pu mettre en évidence l'existence de produits de gènes renfermant des domaines EC mais dont le rôle dans l'adhérence intercellulaire semble limité (gène suppresseur de tumeur *fat*, le gène *dachsous*, proto-oncogène *ret*...).[79]

## 2.2. Structure de la E-cadhérine

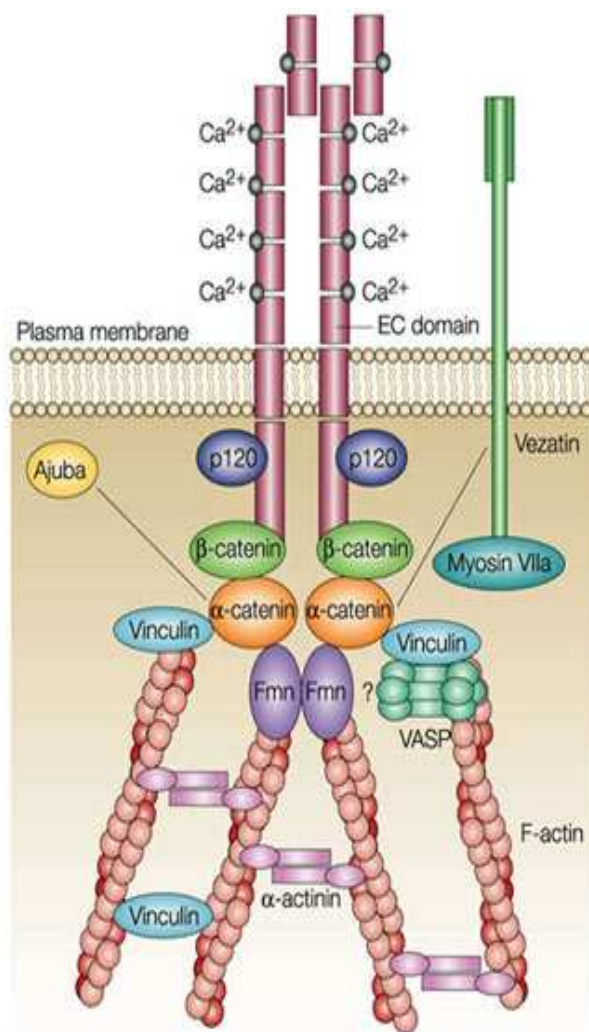
La E-cadhérine (Epithelial-cadherin ou *CDH1*, uvomorulin, CAM120/80...) est le prototype des cadhérines classiques de type I : c'est une glycoprotéine transmembranaire de 120 kD, composée de trois domaines permettant une interconnexion entre le cytosquelette d'actine de deux cellules épithéliales voisines.[69] Le **domaine extracellulaire** N-terminal est de type EC1 avec cinq répétitions permettant à deux molécules de E-cadhérine de former des interactions homophiliques (homotypiques) calcium-dépendantes et de connecter les cellules épithéliales entre elles via la formation d'une jonction en tirette («zip-like»). Il est prolongé par le **domaine transmembranaire**, une séquence riche en résidus hydrophobes qui s'assemblent sous forme

d'hélice- $\alpha$  pour constituer un passage transmembranaire unique. Enfin, le **domaine cytoplasmique** C-terminal interagit avec les autres composants des jonctions adhérentes, en particulier avec les molécules adaptatrices comme les caténines ( $\beta$ ,  $\gamma$  et p120) avec lesquelles la liaison est cruciale pour une adhérence fonctionnelle. Il a été démontré *in vitro* que la fixation de la  $\beta$ -caténine assure une protection du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine contre la protéolyse.[80-81] (cf. figure 10)

			Gene	Nom	Origine Nominative	
Cadhérines "types classiques"	Cadhérines classiques	type I	CDH1	E-cadherin	Epithelial	
			CDH2	N-cadherin	Neural	
			CDH3	P-cadherin	Placental	
			CDH4	R-cadherin	Retinal	
			CDH15	M-cadherin	Myotubule	
		type II	CDH5	VE-cadherin	Vascular endothelial	
			CDH6	K-cadherin	Kidney	
			CDH7	cadherin 7		
			CDH8	cadherin 8		
			CDH9	cadherin 9 / T1-cadherin		
			CDH10	cadherin 10 / T2-cadherin		
			CDH11	OB-cadherin	OsteoBlast	
			CDH12	cadherin 12 / N2-cadherin	Neural 2	
			CDH18	cadherin 18		
			CDH19	cadherin 19		
			CDH20	cadherin 20		
			CDH23	cadherin 23 / NE-cadherin	Neurosensory Epithelium	
			Cadhérines desmosomales	DSC1	Desmocollin 1	
				DSC2	Desmocollin 2	
				DSC3	Desmocollin 3	
	DSG1	Desmoglein 1				
	DSG2	Desmoglein 2				
	DSG3	Desmoglein 3				
	Cadhérines tronquées	CDH13	T-cadherin / H-cadherin	Truncated / Heart		
		CDH16	KSP-cadherin	Kidney Specific		
		CDH17	LI-cadherin	Liver Intestine		
Cadhérines "non classiques"	Protocadhérines		PCDH	PCDH family proteins		
	Autres protéines à domaine EC	FAT1	fat tumor supressor homologue			
		DCHS1/2	dachsous homologue			
		RET	ret proto-oncogene homologue			

**Tableau 3 : Classification des cadhérines humaines.**

Les modèles de souris KO *Cdh*  $-/-$  ont permis de mieux élucider les rôles spécifiques des différentes cadhérines. La E-cadhérine est exprimée dans les étapes précoces du développement embryonnaires et les souris déficientes pour cette protéine meurent des suites de défauts de cohésion dans l'ectoderme au bout de 8 jours (E8,5 : souris *Cdh1*  $-/-$ ). La N-cadhérine est exprimée plus tardivement et se révèle essentielle pour la maturation du neurectoderme : les souris *Cdh2*  $-/-$  meurent à E10 des suites de nombreuses malformations (absence de vrais somites, structures nerveuses atrophiées, absence de développement du tube cardiaque). Le KO de la P-cadhérine (*Cdh3*  $-/-$ ) n'est pas létal et s'accompagne de retards dans la différenciation des glandes mammaires sans perte de la fonction sécrétoire. Pour finir, la VE-cadhérine ne peut être suppléée dans l'angiogenèse et son invalidation entraîne un décès précoce des embryons dont les vaisseaux sanguins sont déformés et perméables (E10,5 : souris *Cdh5*  $-/-$ ). [82-84]



**Figure 10 : Complexes moléculaires organisant les jonctions adhérentes.**

*D'après (Kobielak, A. & Fuchs, E. ; 2004) [85]*

Les jonctions adhérentes constituent un lien structural et fonctionnel entre les réseaux d'actine de deux cellules adjacentes. La E-cadhérine est un élément central de ces complexes, elle est reliée aux microfilaments par des protéines cytoplasmiques de la famille des caténines ( $\alpha$ ,  $\beta$ , p120). La présence de molécules de myosines permet de réaliser des contractions de la membrane plasmique dans des contextes très particuliers. Dans les jonctions adhérentes, les filaments d'actine sont structurés et stabilisés par des dimères d' $\alpha$ -actinine. (*cf. figure 5*)

### 2.3. Le chaînon indispensable : les caténines

Le mot **caténine** provient du latin «*catena*» qui signifie «chaîne». Ces protéines établissent un lien entre les cadhérines et le réseau d'actine par un processus dynamique pour assurer une certaine rigidité mécanique de la cellule.[86-87] La formation des jonctions adhérentes via la E-cadhérine module donc l'organisation fondamentale du cytosquelette d'actine et les rho-GTPases sont fortement impliquées dans la mise en place des jonctions adhérentes en même temps que celle du réseau d'actine corticale.[88] Les jonctions adhérentes sont également des sites de nucléation très actifs pour les microfilaments, en particulier grâce à la vinculine qui s'associe aux jonctions et initie la nucléation par le recrutement de WASP et du complexe Arp2/3.[89] Ce réseau est d'autant plus complexe du fait qu'il vient s'interconnecter avec les microtubules astraux par l'intermédiaire de la protéine **IQGAP1**. [90-91] La famille des caténines comprend la  $\beta$ -caténine, la p120-



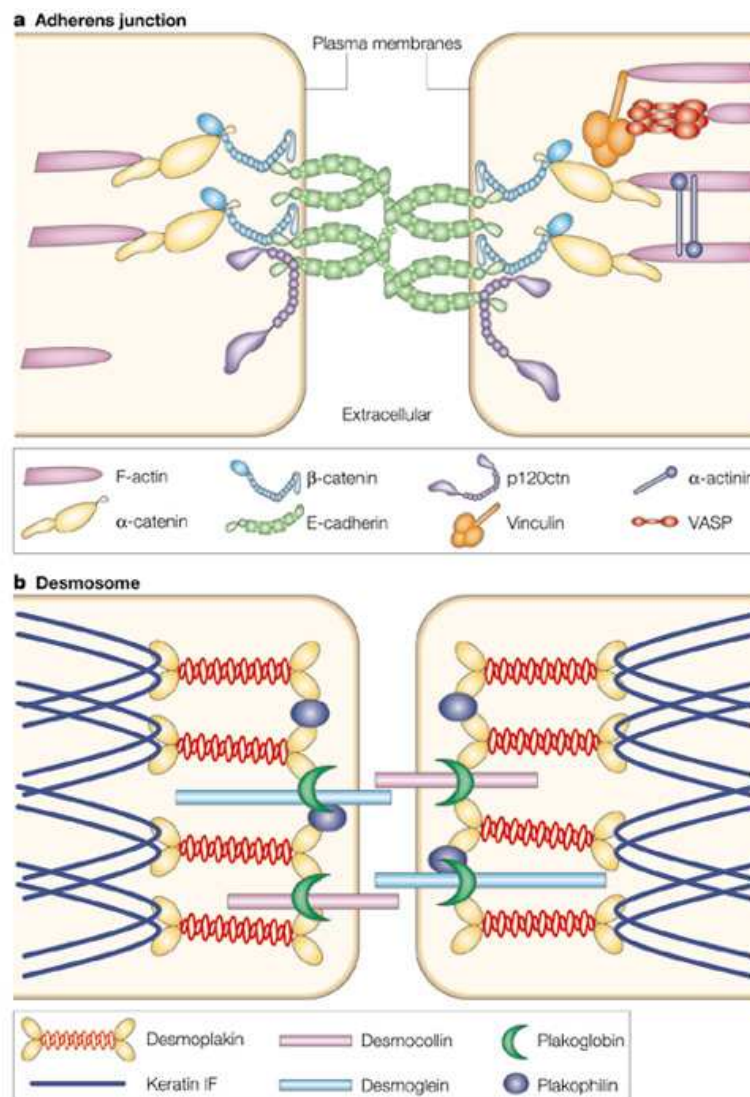
caténine, la  $\gamma$ -caténine (ou plakoglobine) et l' $\alpha$ -caténine. La  $\beta$ -caténine, la **p120-caténine** et la  $\gamma$ -caténine sont des protéines de la famille Armadillo caractérisées par des répétitions de motifs «armadillo» ou «arm» dont le rôle est de favoriser les interactions protéine-protéine et former des complexes multiprotéiques. Dans les jonctions adhérentes, on trouve essentiellement la p120-caténine, la  $\beta$ -caténine et l' $\alpha$ -caténine, un homologue de la vinculine également responsable de l'assemblage et la stabilisation des filaments d'actine.[92] L'isoforme  **$\beta$ -caténine** est l'homologue d'*Armadillo* (*drosophila melanogaster*) chez les vertébrés et joue un rôle particulièrement déterminant dans la stabilité des jonctions adhérentes.[93-94] Elle contient 13 répétitions «arm» de 42 acides aminés qui forment une triple hélice- $\alpha$ .[95] Elle est capable de lier le domaine cytoplasmique C-terminal de la E-cadhérine et de l' **$\alpha$ -caténine**, formant ainsi un complexe ternaire. L'interaction entre la  $\beta$ -caténine et le domaine cytoplasmique C-terminal de la E-cadhérine est majoritairement régulée par des phénomènes de phosphorylation.[96] L'invalidation des caténines révèle des rôles déterminants pour ces protéines dès les premiers stades de l'embryogenèse : les souris  $\beta$ -caténine -/- meurent précocement suite à des défauts de gastrulation ; les embryons déficients pour la  $\gamma$ -caténine succombent de problèmes cardiaques liés à des défauts dans l'adhérence cellulaire et le KO de l' $\alpha$ -caténine est létal dès le stade morula, du fait d'anomalies dans les contacts jonctionnels entre les blastomères.[84, 97] (source : <http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-02252010-221121/unrestricted/these.pdf>)

### 3 - Desmosomes et cadhérines desmosomales

Comme les jonctions adhérentes, les desmosomes appartiennent à la famille des jonctions d'ancrage. Ils permettent de fixer solidement deux cellules épithéliales adjacentes et participent à la cohésion tissulaire en permettant l'ancrage des filaments intermédiaires de deux cellules voisines en un même point d'adhésion. Ils présentent une morphologie ultrastructurale caractéristique en bouton pression et sont répartis de manière organisée dans la zone sous-jacente à la zonula adherens.

Les desmosomes sont organisés autour de glycoprotéines transmembranaires, les **cadhérines desmosomales** (desmocolline : DSC et desmoglérine : DSG), dont la structure est proche de celle des cadhérines classiques, mais responsables d'une interaction homophile beaucoup plus faible. Dans les cellules de l'épiderme, cette interaction peut être hétérophile et se faire par l'assemblage d'une desmoglérine avec une desmocolline ancrée dans la membrane de la cellule voisine.[98-99] (cf. figure 11) Les domaines extracellulaires sont situés dans l'espace intercellulaire desmosomal pour assurer l'adhésion entre les cellules voisines de manière calcium-dépendante. La partie intracellulaire de ces protéines est associée aux **plaques desmosomales** où sont présentes de nombreuses protéines cytoplasmiques, permettant l'insertion des filaments intermédiaires de cytokératines.[100-101] Parmi ces protéines, on trouve la **plakophiline** (PKP) et la **plakoglobine** (PKG ou  $\gamma$ -caténine), deux protéines de la famille *armadillo* dont la structure est voisine de celle de la  $\beta$ -caténine.[102]

Ces molécules adaptatrices lient les cadhérines aux **desmoplakines** (DP : famille des plakines) qui viennent s'attacher aux filaments intermédiaires de cytokératines. Les desmoplakines les plus représentées dans les cellules épithéliales sont la plectine, l'envoplakine et la périplakine.[103-104]



**Figure 11 : Complexes moléculaires dans les jonctions adhérentes et desmosomes.**

*D'après (Fuchs, E. et al. ; 2002) [98]*

Dans les jonctions adhérentes comme dans les desmosomes, des cadhérines transmembranaires assurent une interaction calcium-dépendante et transmettent un contact mécanique au cytosquelette (actine / cytokératines) par l'intermédiaire de protéines de la famille armadillo (caténines / desmoplakines). **(a)** Dans le cas des jonctions adhérentes, les cadhérines classiques (type I) réalisent des interactions strictement homophiliques alors que **(b)** dans les desmosomes, on peut trouver des arrangements hétérophiliques ou homophiliques.

#### 4 - Les jonctions communicantes (Gap junctions)

Elles sont présentes dans toutes les cellules qui établissent des contacts, permettent le passage intercellulaire d'ions et de petites molécules et assurent également un couplage électrique entre les membranes (neurones, cellules musculaires). Dans les cellules épithéliales, elles ne participent que très peu à la cohésion intercellulaire mais profitent de l'espace intermembranaire restreint favorisé par la Zonula Occludens, les desmosomes et les jonctions adhérentes. Elles sont constituées de protéines transmembranaires, les **connexines**, qui s'assemblent en complexes hexamériques (les connexons) afin de former des pores de 2 nm entre deux cellules épithéliales adjacentes.[105-106]



## ***D. Les complexes jonctionnels cellule-matrice***

### **1 - La membrane basale**

#### **1.1. Organisation générale**

La membrane basale est un type de Matrice Extracellulaire (MEC / ECM : *ExtraCellular Matrix*) spécialisé, fournissant un support structural et une interface de 50 à 800 nm entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent. C'est la structure sur laquelle vont reposer tous les épithéliums et grâce à laquelle la nutrition cellulaire est assurée. Elle est impliquée dans le contrôle de la croissance et de la différenciation de l'épithélium en formant une barrière à une éventuelle croissance en profondeur. On la retrouve également accolée à la face baso-latérale des cellules endothéliales, des adipocytes ou encore des cellules musculaires lisses. La membrane basale est formée de deux couches successives de fibres : la lame réticulaire (*lamina reticularis*) et la lame basale (elle-même subdivisée en deux couches : la *lamina lucida* et la *lamina densa*, plus opaque). La lame basale est un mince feuillet de glycoprotéines sécrétées par les cellules épithéliales (ou endothéliales) composé essentiellement de protéoglycanes, de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et d'entactine.[107] (*cf. figure 12*)

#### **1.2. Composants moléculaires de la lame basale**

- Les **laminines** représentent une famille de glycoprotéines constituées de complexes trimériques d'environ 400 kD, composés de trois chaînes enroulées en hélice ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Il existe différentes isoformes pour chacune de ces chaînes ( $\alpha 1-5$ ,  $\beta 1-4$  et  $\gamma 1-3$ ), donnant 15 associations possibles.[108] Dans la lame basale des cellules épithéliales non transformées, la laminine majoritaire est le complexe  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  (laminine 111 ou laminine 1), codé par trois gènes distincts : LAMA1, LAMB1 et LAMC1, respectivement. Les chaînes de laminine sont sécrétées individuellement ( $\alpha$ ) ou sous forme de dimères ( $\beta\gamma$ ) dans l'espace basal par les cellules épithéliales ou les cellules du tissu conjonctif sous-jacent.[109] Elles s'assemblent en un réseau de mailles fines, structuré autour de molécules de collagène IV.[110]

- Le **collagène de type IV** peut représenter jusqu'à la moitié du volume de la membrane basale. C'est une forme de collagène non fibrillaire caractérisée par la présence d'un domaine globulaire (domaine NC : Non Collagénique) dont la structure diffère de celle des collagènes fibrillaires (*cf. Chapitre III*) Chez les mammifères, il existe six formes différentes de collagène de type IV synthétisées par les cellules épithéliales.[111] La membrane basale est également composée d'autres collagènes globulaires dont l'expression est beaucoup moins importante et variable selon les tissus épithéliaux (types VII, XV et XVIII).[112]

- Les **entactines** représentent 2 à 3 % de la membrane basale et existent sous deux formes, chacune composée de trois domaines globulaires (G1, G2 et G3). Les entactines peuvent se fixer au collagène IV, à la laminine, au perlecan et à la fibronectine.

- Enfin, le **perlecan** est un protéoglycane de type héparane-sulfate formé de cinq domaines différents (domaines I-V) assemblés en un complexe de 400-450 kD composé de protéines et de glycosaminoglycanes (GAGs) articulés autour de l'acide hyaluronique. Les protéines branchées autour de cette molécule peuvent se lier à l'entactine, au collagène IV et à d'autres protéoglycanes et GAGs pour former un réseau capable d'ancrer les différentes intégrines qui traversent la membrane cellulaire baso-latérale.[111]

## 2 - Interactions avec la lame basale : contacts cellule / matrice

### 2.1. Les intégrines

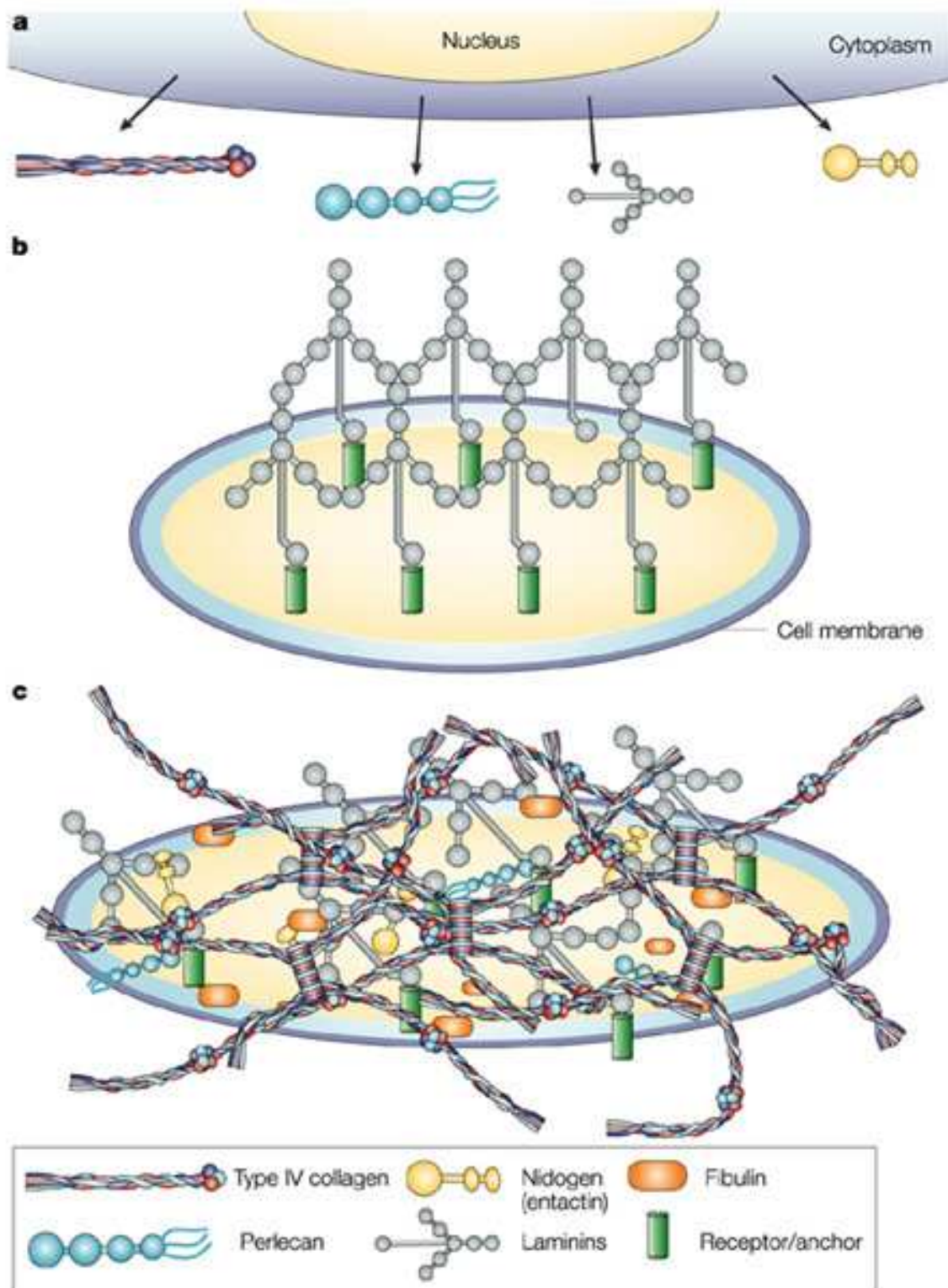
Ce sont de loin les molécules d'adhérence les plus dynamiques de la cellule ; elles constituent des complexes transmembranaires très semblables à ceux formés par les cadhérines classiques et desmosomales. Elles s'assemblent sous forme d'un hétérodimère composé d'une sous-unité  $\alpha$  (PM : 150 à 200 kD) et une sous-unité  $\beta$  (PM : 90 à 110 kD) qui possèdent chacune un site de liaison pour les cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ). La présence de  $\text{Ca}^{2+}$  est essentielle pour la liaison des intégrines à leur contre-récepteur, une protéine de la matrice extracellulaire contenant une ou plusieurs séquences RGD (Arginine-Glycine-Aspartate). L'intégrine fonctionnelle majoritaire dans les cellules épithéliales est un **dimère alpha6-beta4** ( $\alpha 6 \beta 4$ ) qui se lie à la lamine 1 de la lame basale au niveau des hémidesmosomes.[113] Dans certains épithéliums, on trouve également en moindre quantité les intégrines  $\alpha 1 \beta 1$ ,  $\alpha 2 \beta 1$  et  $\alpha 3 \beta 1$  qui fixent surtout les fibres de collagène et parfois la laminine.[114-115]

### 2.2. Les hémidesmosomes

La structure des contacts cellule-matrice est très semblable à celle des desmosomes en microscopie électronique et ces deux structures possèdent d'ailleurs entre elles une communication mécanique par l'intermédiaire des filaments de cytokératines. La connexion de la plaque hémidesmosomale aux tonofilaments se fait, comme dans les desmosomes, grâce à des protéines de la famille des plakines : la **plectine** ainsi que l'antigène 1 de la pemphigoïde bulleuse (**BPAG1** : *bullous pemphigoid antigen-1*) possèdent un domaine C-terminal de liaison à la cytokératine.

Un autre composant très particulier des hémidesmosomes est la protéine **BPAG2** (*bullous pemphigoid antigen-2*) ; cette molécule est formée d'un petit domaine globulaire capable d'interagir avec l'intégrine  $\beta 4$  et d'une longue chaîne transmembranaire de type «collagen like».

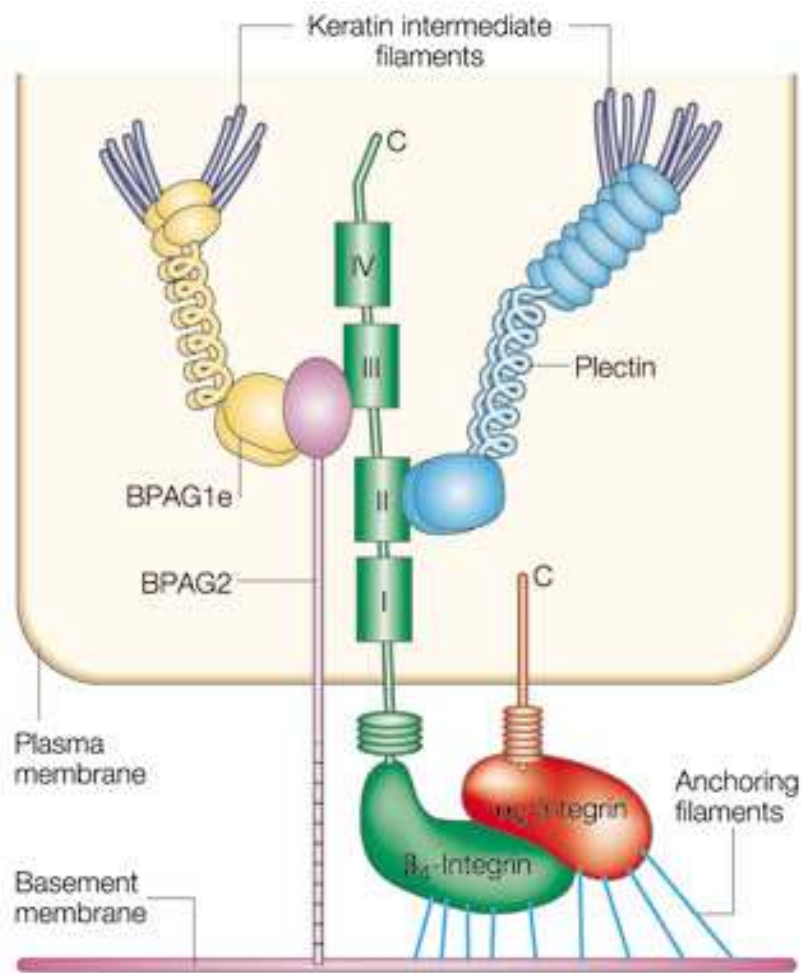
Les hémidesmosomes sont en contact avec de nombreuses protéines associées aux fonctions vitales de la cellule, ils interagissent par exemple avec les complexes protéiques contrôlant le cycle cellulaire qui est ainsi sous la dépendance de la mise en place des contacts avec la laminine.[113] (*cf. figure 13*)



**Figure 12 : Composants de la membrane basale.**

*D'après (Kalluri R. et al. ; 2003). [112]*

Ce schéma reprend les étapes de sécrétion (a) et d'assemblage (b,c) des éléments de la lame basale des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins mais cette structure est commune à tous les épithéliums. Les protéines de la membrane basale qui forment des polymères sont la laminine et le collagène de type IV. Ces polymères interagissent avec les protéoglycanes, le perlecan et le nidogène. A la surface des cellules, les intégrines interagissent avec les différents constituants de la MB et stabilisent le complexe.



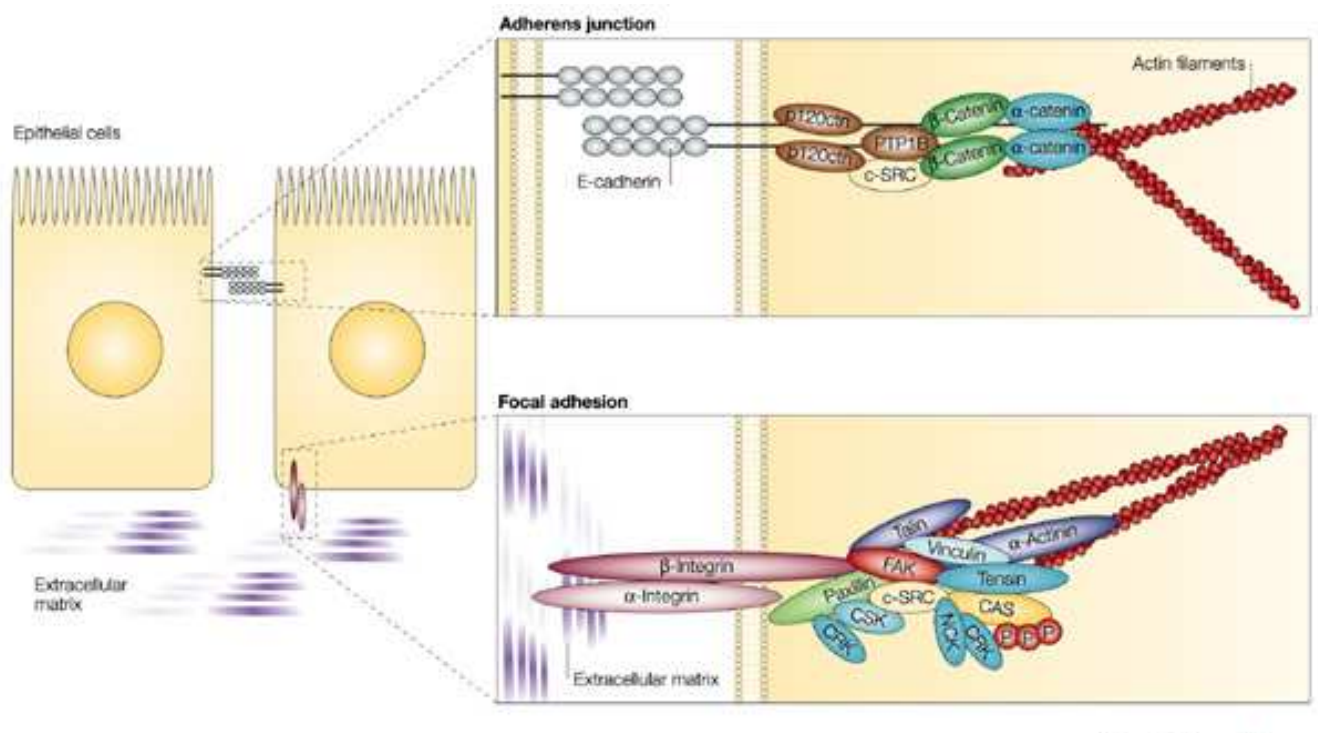
**Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation des hémidesmosomes.**  
D'après (Fuchs, E. & Raghavan, S. ; 2002) [98]

Les filaments intermédiaires (*Keratin intermediate filaments*) sont connectés aux hémidesmosomes avec une organisation similaire à celle des desmosomes. Les membres de la famille des plakines (*plectin*, *BPAG1*) sont fonctionnellement proches des de la desmoplakine ; la protéine *BPAG2* est une molécule formée d'un petit domaine globulaire interagissant avec l'intégrine  $\beta 4$  et d'un domaine transmembranaire «collagen like». Dans les cellules épithéliales, l'intégrine fonctionnelle est formée d'un hétérodimère  $\alpha 6\beta 4$  capable d'interagir avec la lamine 5 présente dans la lame basale.

### 2.3. Contacts focaux dans les cellules épithéliales

Ce sont des structures d'ancrage extrêmement performantes dont l'organisation moléculaire évolue en fonction des tensions mécaniques entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine.[116] Leur organisation est assez similaire à celle des jonctions adhérentes, avec de nombreux adaptateurs moléculaires qui permettent de stabiliser la liaison entre les microfilaments et les intégrines. L'intégrine majoritaire dans les contacts focaux est normalement l'hétérodimère  $\alpha 5\beta 1$ , un récepteur de la fibronectine fortement exprimé dans les cellules fibroblastiques motiles. (cf. *Chapitre III*) Dans les cellules épithéliales, ces contacts peuvent s'établir de façon transitoire au niveau de la lame basale entre d'autres intégrines de type  $\beta 1$  ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ) et le collagène IV ou la laminine.[117-119]

Ce type d'interaction s'effectue principalement au cours de l'organogenèse des tissus épithéliaux rénal, pulmonaire et épidermique.[120-121] L'existence de ces contacts dans les cellules épithéliales permet de favoriser la communication entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, renforçant ainsi la coordination de l'ensemble des fonctions de la cellule par l'intégration de données mécaniques. Les protéines de la famille des rho GTPases jouent un rôle particulièrement déterminant dans la régulation de l'association et la dissociation de ces complexes. (cf. figure 14)



**Figure 14 : Modèle comparatif de l'organisation moléculaire des contacts focaux et des jonctions adhérentes.**

D'après (Yeatman, TJ ; 2004) [117]

L'organisation des contacts focaux et des jonctions adhérentes présente de nombreuses similitudes : divers adaptateurs moléculaires stabilisent la liaison entre les microfilaments et la membrane plasmique. Les contacts focaux « matures » sont formés d'un dimère d'intégrine  $\alpha/\beta$  complexé à des protéines de stabilisation (vinculine, tensine, taline, paxilline...) et des régulateurs de la dynamique d'assemblage des microfilaments ( $\alpha$ -actinine, rho GTPases, kinases Src et FAK...). Dans les jonctions adhérentes, ces fonctions sont assurées par les protéines de la famille des caténines. (cf. figure 11)

# CHAPITRE II : Plasticité des tissus épithéliaux

## A. Généralités

### 1 - Plasticité épithéliale et transdifférenciation

La plasticité d'une cellule épithéliale est définie comme sa capacité à modifier sa morphologie en réponse à des facteurs extérieurs sécrétés lors de situations physiologiques (cycles hormonaux, périodes de gestation, changements d'environnements...) ou au contraire pathologiques (irritation, inflammation...). Dans les tissus épithéliaux fonctionnels ou tumoraux, on peut observer cinq grands types de plasticité épithéliale en fonction du tissu d'origine et de son devenir. La leucoplasie, l'hyperplasie et la métaplasie se rapportent à des phénomènes de «transdifférenciation» au cours desquels les cellules demeurent cohésives mais s'orientent vers un autre état fonctionnel de différenciation épithéliale. Les deux autres formes de plasticité épithéliale : la néoplasie et la transition épithélio-mésenchymateuse impliquent au contraire des changements morphologiques et génotypiques multiples pouvant parfois aboutir à une «dédifférenciation» des cellules concernées.

- **La leucoplasie** (ou leucokératose) correspond à des zones de kératinisation qui se forment au sein d'un épithélium qui, normalement, n'est pas kératinisé. Elle peut concerner l'épithélium buccal, labial ou génital et, en l'absence de résection, son évolution à long terme est souvent tumorale.

- **L'hyperplasie** est une multiplication cellulaire anarchique, en général accrue sous l'effet d'un traumatisme. Elle peut conduire un épithélium unistratifié à se changer en un épithélium pluristratifié. Son évolution donne lieu à une hypertrophie locale et souvent transitoire de l'épithélium concerné.

- **La métaplasie** implique toute autre conversion d'un tissu épithélial donné en un autre type d'épithélium en réponse à un stress chimique ou mécanique. L'exemple le plus connu chez l'être humain est la métaplasie malpighienne de l'épithélium glandulaire des bronches qui se produit chez les fumeurs. Une transdifférenciation des cellules hépatiques en cellules pancréatiques est également observée dans le foie cirrhotique mais de tels événements restent rares dans les cellules humaines et sont plus couramment décrits dans des cultures *in vitro*. [122-123] De façon intéressante, les phénomènes métaplasiques sont beaucoup plus démonstratifs chez des espèces plus primitives (lézards, tritons, salamandres...) et peuvent aboutir à des reconstructions totales d'organes à partir de tissus épithéliaux différenciés. La perte de cette plasticité au cours de l'évolution semble indiquer que la complexification des fonctions associées aux cellules épithéliales s'est faite en parallèle d'une différenciation croissante de moins en moins réversible. [124]

## 2 - La néoplasie

L'acquisition de propriétés tumorales par une cellule épithéliale représente une autre caractéristique de leur plasticité, connue sous le terme de néoplasie (littéralement : *nouvelle croissance*). Un néoplasme (ou néoformation) est un tissu récent organisé par des cellules morphologiquement et fonctionnellement différentes de celles du tissu d'origine et rassemblées sous forme d'une tumeur (du latin *tumere*, enfler) bénigne ou maligne présentant une structure et une coordination fonctionnelle faible, voire nulle, avec le tissu environnant. Les cellules composant un tissu néoplasique sont autonomes et échappent donc à la régulation par différents mécanismes sous les ordres de l'organisme. L'absence d'homéostasie (équilibre régulé par l'organisme) entraîne un développement trop important par multiplication excessive. Ainsi, la néoplasie peut être considérée comme la création d'un tissu formé par des éléments remplaçant ceux d'un tissu antérieur sans rien leur emprunter.[125] Elle peut concerner n'importe quel type de tissu et survenir chez tous les êtres vivants, y compris les plantes.

On en distingue deux catégories en fonction de leur gravité :

Les néoplasies bénignes sont des tumeurs souvent sans conséquences dramatiques, présentant une croissance lente et une organisation bien délimitée ne pouvant donner lieu à des tumeurs secondaires (métastases). Les cellules qui les composent sont généralement homogènes, en concentration faible (beaucoup de stroma) et présentent peu d'altérations génétiques ; c'est le cas par exemple des grains de beauté et de certaines verrues. Une tumeur bénigne peut parfois entraîner des complications graves (compression, inflammation...) par son action mécanique.[126]

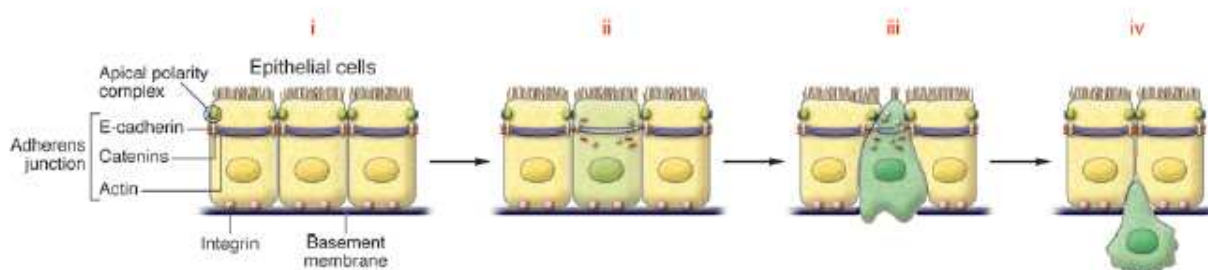
A l'inverse, les tumeurs malignes sont généralement mal délimitées à leur périphérie ce qui peut donner lieu à leur dissémination sous forme de métastases qui se propagent à travers le sang ou la lymphe. Les cellules cancéreuses malignes sont souvent très hétérogènes au sein de la tumeur à cause d'un taux de mutation extrêmement élevé qui peut leur conférer une activité de prolifération très intense. Cependant, les cellules issues d'une même tumeur conservent toujours certaines caractéristiques moléculaires et génétiques du tissu dont elles proviennent ce qui permet de définir un certain nombre de critères de classification basés sur le tissu d'origine et l'état de gravité pour le patient (grade).[127]

(Source : <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/neoplasie-3192.html>)



## B. Le concept de transition épithélio-mésenchymateuse

La Transition Épithélio-Mésenchymateuse (**EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition**) représente la manifestation la plus spectaculaire de la plasticité des cellules épithéliales et, dans les cas les plus extrêmes, on peut observer une décomposition presque totale de toutes les structures moléculaires typiques de la cellule épithéliale (*cf. chapitre I*). Le terme EMT est avant tout un concept (*ami ou ennemi ?*) regroupant plusieurs processus biologiques présentant des similitudes mais aussi de grandes différences. Parmi ces processus, on compte la morphogenèse de nombreuses structures embryonnaires et adultes, la régénération tissulaire (cicatrisation, fibroses...) et la progression métastatique des carcinomes.[128-130] Dans ce chapitre, les différents contextes physiologiques et pathologiques qui impliquent la conversion d'une cellule épithéliale en cellule «fibroblastoïde» seront analysés. Les chapitres III et IV traiteront plus précisément des aspects moléculaires et cellulaires associés à l'EMT.



**Figure 15 : Les étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse.**

D'après (Acloque, H. *et al.* ; 2009) [131]

**(i)** Cellules épithéliales cohésives. **(ii)** Diminution de l'expression des constituants des jonctions intercellulaires, perte de la polarité et expression de protéines mésenchymateuses. **(iii)** Remodelages du cytosquelette et expression de protéines contractiles et de protéases de dégradation de la lame basale. **(iv)** Acquisition d'un phénotype fibroblastoïde motile.

### 1 - Définition

La transition épithélio-mésenchymateuse est définie comme le processus au cours duquel :

- (i)** une cellule épithéliale possédant des jonctions adhérentes et une actine corticale.
- (ii)** diminue l'expression de protéines spécifiquement épithéliales (en particulier les constituants des jonctions intercellulaires). Des protéines spécifiquement mésenchymateuses sont également exprimées et la cellule finit par perdre complètement sa polarité.
- (iii)** subit de profonds remodelages dans l'organisation de son cytosquelette, exprime des protéines permettant la contraction des microfilaments et des protéases capables de dégrader la lame basale.
- (iv)** acquiert ainsi un phénotype fibroblastoïde propice à la migration cellulaire ; cette morphologie peut parfois donner lieu à une colonisation des tissus environnants ou éloignés par l'intermédiaire de la circulation sanguine ou lymphatique. (*cf. figure 15*)



Il est important de noter que toutes ces étapes peuvent intervenir simultanément dans une même cellule sous l'influence de la coordination de plusieurs voies de signalisation.

Contrairement au phénotype métaplasique, il existe une tendance à considérer que l'EMT ne correspond pas à un changement de lignage complet (transdifférenciation), et que ces modifications d'expression ne sont la plupart du temps que partielles et transitoires. De plus, dans la plupart des modèles d'étude *in vivo*, l'EMT est réversible. La conversion d'une cellule mésenchymateuse en un dérivé épithélial est nommée Transition Mésenchymo-Epithéliale (MET)

## 2 - Historique de la découverte et évolution de la définition

La découverte de la transition épithélio-mésenchymateuse est attribuée à l'équipe du **Dr Elizabeth Dexter Hay** à la fin des années 60 à Harvard, pour son travail sur la gastrulation de l'embryon de poulet. (*Hay, E.D. et al. ; 1968 : Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo*).[132] Cette étude a permis la mise en évidence de la formation du mésoderme à partir de l'individualisation et la migration des cellules épiblastiques le long de la ligne primitive. Dès 1982, le Dr Hay pose les premières bases de ce concept en décrivant une conservation de ce phénomène embryonnaire dans des tissus épithéliaux adultes soumis à un environnement moléculaire particulier.[133]

Une autre publication «originelle» est parfois citée et correspond en fait à la première description de l'EMT dans un tissu endothélial : l'équipe de David Bolender désignait en effet dès 1979, sous le terme de «Epithelial-Mesenchymal Transformation», le changement phénotypique des cellules endothéliales des bourrelets endocardiques au cours de la formation des valves cardiaques (septation) chez l'embryon de poulet également.[134]

Depuis ces premières descriptions, une pléthore de publications est apparue, présentant l'observation de ce phénomène dans de nombreux modèles cellulaires ainsi que dans des systèmes *in vivo*, en faisant mention de «transformation épithélio-mésenchymateuse» puis de transdifférenciation et enfin de transition. Les deux premiers termes utilisés portent toutefois à confusion car ils ne permettent pas de distinguer l'EMT des autres processus dynamiques tels que la néoplasie (transformation cancéreuse) ou la métaplasie (transdifférenciation des cellules épithéliales adultes). En 2003, à l'issue du premier «International EMT Meeting» à Port Douglas (Australie), les chercheurs du réseau TEMTIA (*The EMT International Association*) se sont accordés sur le terme transition à cause de l'aspect souvent réversible et transitoire de l'EMT de par le processus de Transition Mésenchymo-Epithéliale (MET).[131]

### C. Fonctions biologiques de l'EMT et modèles de classification

Une recherche sur Pubmed effectuée le 25/07/2010 affiche 2607 résultats dont 448 revues pour les termes «epithelial-mesenchymal transition». Parmi cet ensemble de publications, si la plupart font référence à des mécanismes cellulaires communs tels que la perte de cohésion et de l'acquisition de motilité cellulaire, il n'est pas évident de distinguer les caractéristiques spécifiques de contextes biologiques particuliers. Dans les diverses descriptions d'EMTs correspondant à la mise en place de structures embryonnaires et celles impliquées dans des mécanismes physio-pathologiques telles que la cicatrisation ou la transformation cancéreuse, on retrouve de nombreuses différences dans l'activation ou l'inhibition des voies de signalisation cellulaire. De plus, il est désormais établi que l'EMT peut générer des cellules présentant des états de différenciation variables. Les bases moléculaires de ce phénomène ne sont pas encore totalement claires mais il semble que l'on puisse distinguer les transitions conduisant à un nouvel état de différenciation (apparenté à une **trans-différenciation**) de celles conduisant à une **dé-différenciation** (acquisition de propriétés semblables à celles des cellules souches : stem cells). De même, au niveau phénotypique, son caractère réversible n'est pas toujours évident et on peut observer dans un même tissu une EMT complète ou partielle (phénotypes intermédiaires stables).[135-136] Ainsi, au cours des deux dernières années, plusieurs modèles de classification ont été proposés afin de clarifier cette situation. A l'occasion des derniers congrès internationaux (Cracovie en 2007, Tucson en 2009 et Cold Spring Harbor en Mars 2008), il a été proposé de classer l'EMT en trois sous-types différents selon le contexte biologique dans lequel elle apparaît.[124, 129, 131, 137] (cf. figures 16 et 19)

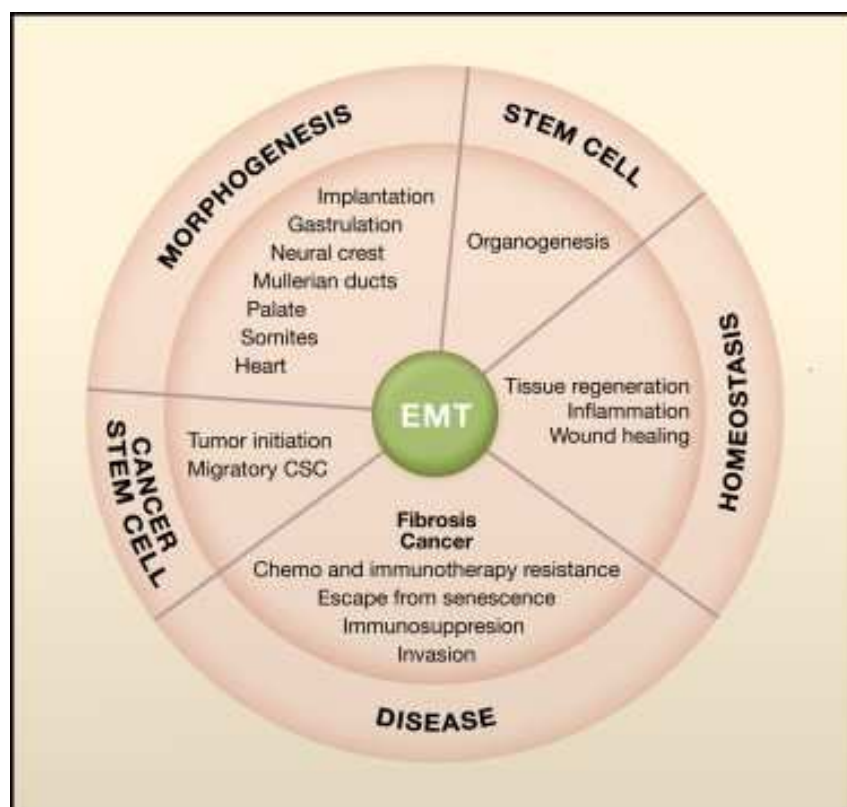


Figure 16 : Rôles multiples de la transition épithélio-mésenchymateuse.  
D'après (Thierry, J.P. *et al.* ; 2009) [138]

## **1 - Développement embryonnaire et organogenèse (type 1)**

Durant le développement embryonnaire, l'organisation tridimensionnelle de nombreux organes nécessite très tôt la migration coordonnée de groupes de cellules qui répondent à la stimulation de signaux chimiques extracellulaires. Les EMT de type 1 sont la «raison d'être» évolutive de la plasticité épithéliale par transition et impliquent tous les processus décrits dans l'embryogenèse, particulièrement lors de la gastrulation et du développement du système nerveux.[131, 138] L'EMT de type 1 permet également des étapes de morphogenèse pouvant intervenir dans l'homéostasie chez l'adulte (glande mammaire, utérus, néo-angiogenèse...).[139-142] Ce type d'EMT se fait sous le contrôle de signaux locaux et aboutit à des phénotypes mésenchymateux transitoires et réversibles destinés à générer des épithéliums secondaires. Les cellules mésenchymateuses issues de l'EMT de type 1 sont diverses mais ont en commun une conservation relative du degré de pluripotence des cellules épithéliales primaires dont elles sont issues (cellules épithéliales directement issues des blastomères et n'ayant jamais activé d'EMT).[131]

### **1.1. EMT dans les tissus épithéliaux primaires**

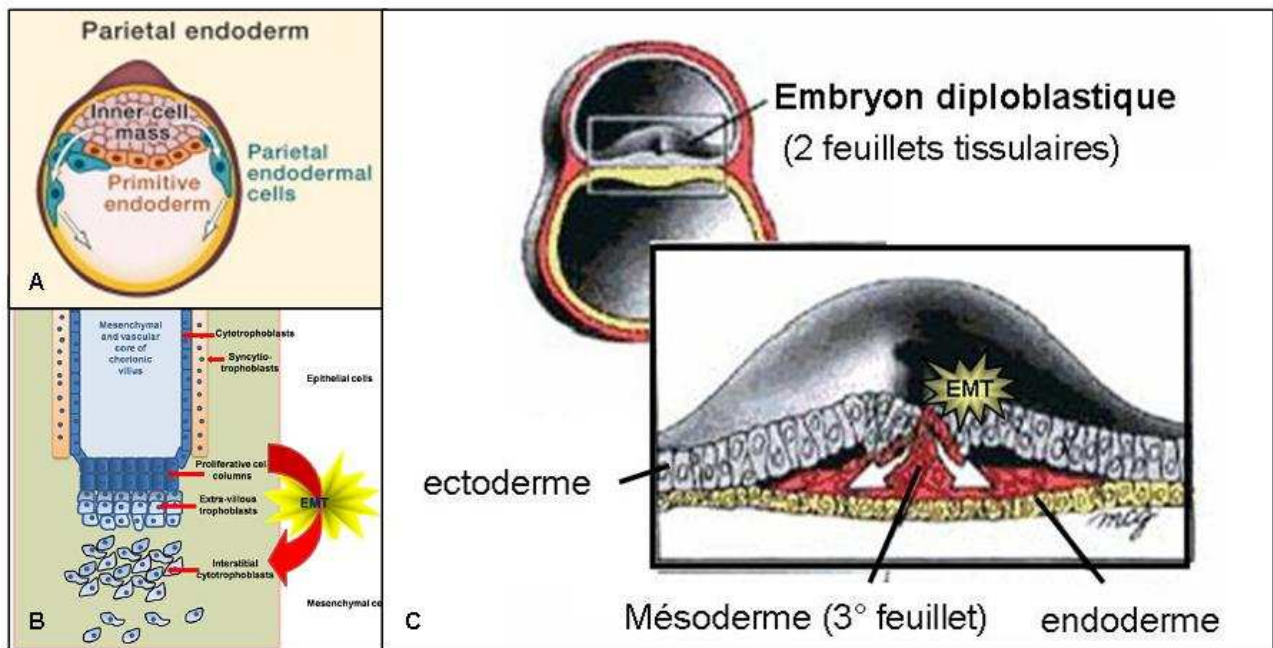
Au cours de l'évolution des êtres vivants pluricellulaires, l'apparition d'un troisième feuillet embryonnaire correspond sans doute à l'une des étapes majeures ayant permis l'accentuation de la diversité cellulaire et de la spécialisation des espèces qui ont conduit à l'apparition des hominidés. Le tissu mésodermique est ainsi probablement apparu pendant le règne des cnidaires marins (méduses, hydres...) avec les premiers gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse, il y a plus de 700 millions d'années (ère précambrienne) et ce mécanisme a été conservé dans toutes les espèces qui ont suivi, de l'explosion cambrienne jusqu'à l'apparition des mammifères.

Chez l'être humain, l'apparition des cellules épithéliales et leur conversion en cellules mésenchymateuses sont des étapes très précoces qui peuvent être observées dès le stade de pré-implantation. Après libération dans les trompes de Fallope et fécondation, l'œuf devenu diploïde entame rapidement une succession de divisions cellulaires à un rythme d'une mitose toutes les 10h. Durant les premiers jours, l'amas embryonnaire (blastula) se segmente ainsi de façon exponentielle, sans variation significative de son volume global. A ce stade, toutes les cellules filles (blastomères) sont identiques et possèdent un noyau enfermant une copie du nouveau génome diploïde. Au stade de 4 cellules, les blastomères établissent des surfaces planes entre eux, ce qui augmente les aires de contact. Les protéines membranaires qui étaient jusque là distribuées uniformément sur les cellules sont maintenant localisées sur une surface apicale bien définie. Les cellules se polarisent et l'embryon passe du stade blastula au stade morula par un phénomène de compaction. Les changements dans les contacts intercellulaires sont principalement dus à la modulation des associations entre les E-cadhérines. Les cellules s'adjoignent ensuite à l'aide de jonctions serrées, de desmosomes et de jonctions gap, et une paroi cellulaire épithéliale étanche se forme. Au stade de 4 cellules, la E-cadhérine est distribuée de façon uniforme sur toute la surface cellulaire et le contact entre les cellules est réduit. A partir du stade 8 cellules, les cadhérines sont activées par le calcium et forment des dimères pour se regrouper en un agrégat ponctuel et immobile. Simultanément, la blastula entame une migration de 6 jours en direction de l'utérus pour rejoindre l'endomètre et s'y implanter (4 jours chez la souris : E4).

La fixation de l'embryon dans la paroi de l'utérus va d'une part entraîner la rupture de la membrane pellucide autour de l'œuf et d'autre part déclencher une série de réorganisations des blastomères en deux masses cellulaires (interne et externe). Les cellules les plus internes vont constituer l'embryoblaste (ou bouton embryonnaire) à l'origine de toutes les structures internes du futur organisme.[143] C'est au cours de cette série de migrations que sont observés les premiers signes d'EMT dans le développement embryonnaire des mammifères : un nombre limité de cellules de la zone extra-embryonnaire va se détacher du reste de l'amas cellulaire cohésif (bouton embryonnaire) pour acquérir un phénotype mésenchymateux, proliférer et migrer le long de la paroi interne de l'œuf pour enfin se ré-épithélialiser par MET et former le **trophoblaste** (ou trophoctoderme) qui délimite le **blastocèle**. [131, 144] Une fois la membrane pellucide complètement rompue, les cellules du trophoblaste continuent de migrer sous forme d'extra-villosités pour s'infiltrer dans l'endomètre utérin maternel et le coloniser pour former le futur placenta, toujours par une série de changements morphologiques de type EMT.[145-146]

Dès la sortie du zygote de sa membrane pellucide (sorte de «premier accouchement»), on distingue deux feuillets cellulaires au sein de l'embryoblaste qui s'aplatit pour prendre une forme de disque. Ces deux feuillets sont les premiers tissus épithéliaux qui apparaissent chez l'embryon lui-même. A ce stade, ils portent les noms d'épiblaste et d'hypoblaste qui donneront respectivement l'**ectoderme** (ou ectoblaste) et l'**endoderme** (ou entoderme ou entoblaste). La **gastrulation** correspond au passage d'un disque embryonnaire diploblastique (2 feuillets) à un disque triploblastique (3 feuillets) par la mise en place d'un troisième tissu fondamental : le **mésoderme** (ou mésoblaste). C'est la troisième étape du développement et la première de la morphogenèse chez tous les métazoaires.[144] (cf. figure 17)

Le mésoderme est un mésenchyme primaire (du latin «*mesenchyma*» : «*meso*», milieu et «*enchyma*», infusion) issu de l'activation d'un programme EMT dans les cellules de l'épithélium épiblastique. Les programmes génétiques et les cascades de signalisation qui conduisent à la mise en place de ce tissu sont actuellement bien décrites dans de nombreux modèles de développement (spongiaires, cnidaires, oursins, nématodes, xénope, poisson zèbre, drosophile, souris...), la mise en place de modèles récents chez le macaque et l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines ont fourni des résultats qui semblent aller dans le sens d'une conservation des mécanismes ancestraux de la gastrulation chez les primates.[131, 147-151] On peut noter que le caractère réversible de l'EMT par les processus de transitions mésenchymo-épithéliales (MET) est probablement apparu plus tard au cours de l'évolution des premiers coelomates protostomiens et de la formation des premiers vrais tissus séreux. (sangues, mollusques et insectes primitifs).[144] (sources : Universités de Fribourg, Lausanne et Berne ; Suisse)



**Figure 17 : EMT primaire au cours de la formation du trophoblaste et du mésoderme.**

Modifié d'après (Thierry, J.P. *et al.* ; 2009) et (Kokkinos, M.I. *et al.* ; 2010) [138, 152]

(A, B) Chez les mammifères, l'EMT primaire intervient très précocement pendant la phase de pré-implantation avec la formation du trophectoderme et lors sa progression dans l'endomètre utérin par délamination des villosités chorioniques (*chorionic villus*). (C) Le mécanisme d'EMT primaire le plus conservé dans l'évolution est sans conteste la gastrulation qui participe à la mise en place d'un troisième feuillet embryonnaire (le mésoderme) et à la formation des structures digestives primitives chez les premiers métazoaires comme les spongiaires ou les cnidaires (*archentéron* ou *protogaster* : *gastrulation* provient initialement du grec «*gastrea*», le ventre ou l'estomac). (Ernst Haeckel, 1872) [153]

Au 17ème jour, le développement de l'embryon humain est marqué par l'épaississement du disque embryonnaire au niveau de la ligne médiane, le long de l'axe céphalo-caudal. (jour E6,5 chez la souris) Cette structure médiane, qui résulte de la prolifération et de la migration des cellules épiblastiques, est appelée ligne primitive et va s'allonger pour occuper environ la moitié de la longueur de l'embryon. Au 19e jour, alors que la ligne primitive s'allonge par addition de cellules à son extrémité caudale et que son extrémité supérieure (dorsale) se creuse en forme de gouttière (sillon primitif), la région rostrale est renforcée par un amas de cellules épiblastiques formant la **ligne primitive** avec le **nœud primitif** (nœud de Hensen chez les oiseaux). Au sein de cette dépression, l'expression de facteurs solubles et de molécules spécifiques va conduire un certain nombre de cellules de l'épithélium épiblastique à entrer dans un programme d'EMT pour s'infiltrer le long de la ligne primitive et rejoindre l'espace intercellulaire entre l'épiblaste et l'hypoblaste. Dans ces cellules initialement cohésives, on observe une répression transcriptionnelle et une relocalisation cytoplasmique de la E-cadhérine qui aboutissent à la délamination de la partie postérieure de l'épiblaste et à l'apparition de cellules mésenchymateuses primaires (PMCs : Primary Mesenchymal Cells). (Ernst Haeckel, 1872) [153]

La morphogenèse du système nerveux est également un phénomène très précoce qui débute au 19ème jour par la formation de la plaque neurale ectodermique qui se creuse en gouttière pour finalement former un tube

creux (**tube neural**) qui s'enfonce progressivement dans le mésoderme (jour25 / E8,5). Cette invagination est accompagnée de la formation d'un «4ème feuillet embryonnaire» à l'origine du système nerveux périphérique (SNP) : les bourrelets neuraux qui deviennent les **crêtes neurales**.

La crête neurale céphalique des vertébrés est une structure embryonnaire transitoire, localisée au niveau de chaque bourrelet neural lorsque ceux-ci se forment précocement au cours du développement au début du stade de neurula. (*Wilhelm His, 1868*) [154] La différenciation des cellules de la crête neurale est un processus en trois étapes (spécification, délamination et migration). L'étape de délamination (jour28 / E9,5) est une des manifestations les plus spectaculaires de l'EMT embryonnaire et probablement l'une des mieux décrites à l'heure actuelle avec la gastrulation. Cette EMT est caractérisée par une individualisation complète des cellules ectodermiques qui leur permet de quitter le neuroépithélium, de migrer et finalement de se différencier une fois leur cible atteinte. Une des caractéristiques essentielles des cellules de la crête neurale se trouve dans leur capacité à donner naissance, en plus du SNP, à une extraordinaire variété de dérivés cellulaires épithéliaux ou non. (*cf. figure 18*) Les cellules des crêtes neurales sont porteuses d'informations de développement capables de produire nombre de tissus de la face et du crâne, en particulier le squelette cartilagineux et ostéo-membraneux, les méninges, les parois vasculaires du système carotidien externe et interne, les tendons des muscles, le derme et la graisse faciale.[155-157] Les cellules de la crête neurale sont à l'origine de nombreuses pathologies (neurocristopathies), la plupart résultant d'un défaut de migration conduisant à la genèse de malformations crânio-faciales.[131, 158-160]

## 1.2. EMT secondaire et tertiaire

Les EMT secondaires et tertiaires de type 1 sont plus tardives (à partir de la 4ème semaine chez l'homme / E12 chez la souris) et impliquent essentiellement les tissus épithéliaux issus de la compaction secondaire du mésoderme par MET (**somites**) ou éventuellement des cellules ré-épithélialisées dérivées de la migration des crêtes neurales. Ces épithéliums embryonnaires ont déjà subi au moins un cycle complet d'EMT/MET et perdu une partie de leurs capacités de pluripotence. Leur transition vers un état mésenchymateux aboutit à des cellules plus différenciées mais capables de s'épithélialiser de novo pour éventuellement entrer vers de nouveaux cycles transitionnels. A titre d'exemple, l'activation d'un programme de type EMT a déjà été observé dans la mise en place du **dermomyotome** et du **sclérotome** à l'origine des composants des muscles squelettiques et de la peau (muscles, tendons, derme et épiderme...), la **fermeture du palais** et la formation des vaisseaux (angiogenèse), des cellules sanguines (hématopoïèse) et des valves endocardiaques (transition endothélio-mésenchymateuse : **EndMT**, Endothelial-to-Mesenchymal Transition).[131, 161-165]

Pour finir, la perte de cohésion (au moins partielle) des cellules épithéliales est particulièrement déterminante dans la morphogenèse des structures tubulaires présentes dans le **pancréas**, le **foie**, les **reins** (régression des canaux de Muller au cours de la néphrogenèse) ou les glandes salivaires. (*cf. figure 18 et tableau 4*) De façon intéressante, cette «EMT tubulaire» peut être «réactivée» chez l'adulte dans les variations morphologiques hormono-dépendantes que subissent l'**endomètre utérin** ou la **glande mammaire** à la puberté et pendant les cycles menstruels et la gestation.[138, 166-169] (*cf. chapitre IV*)



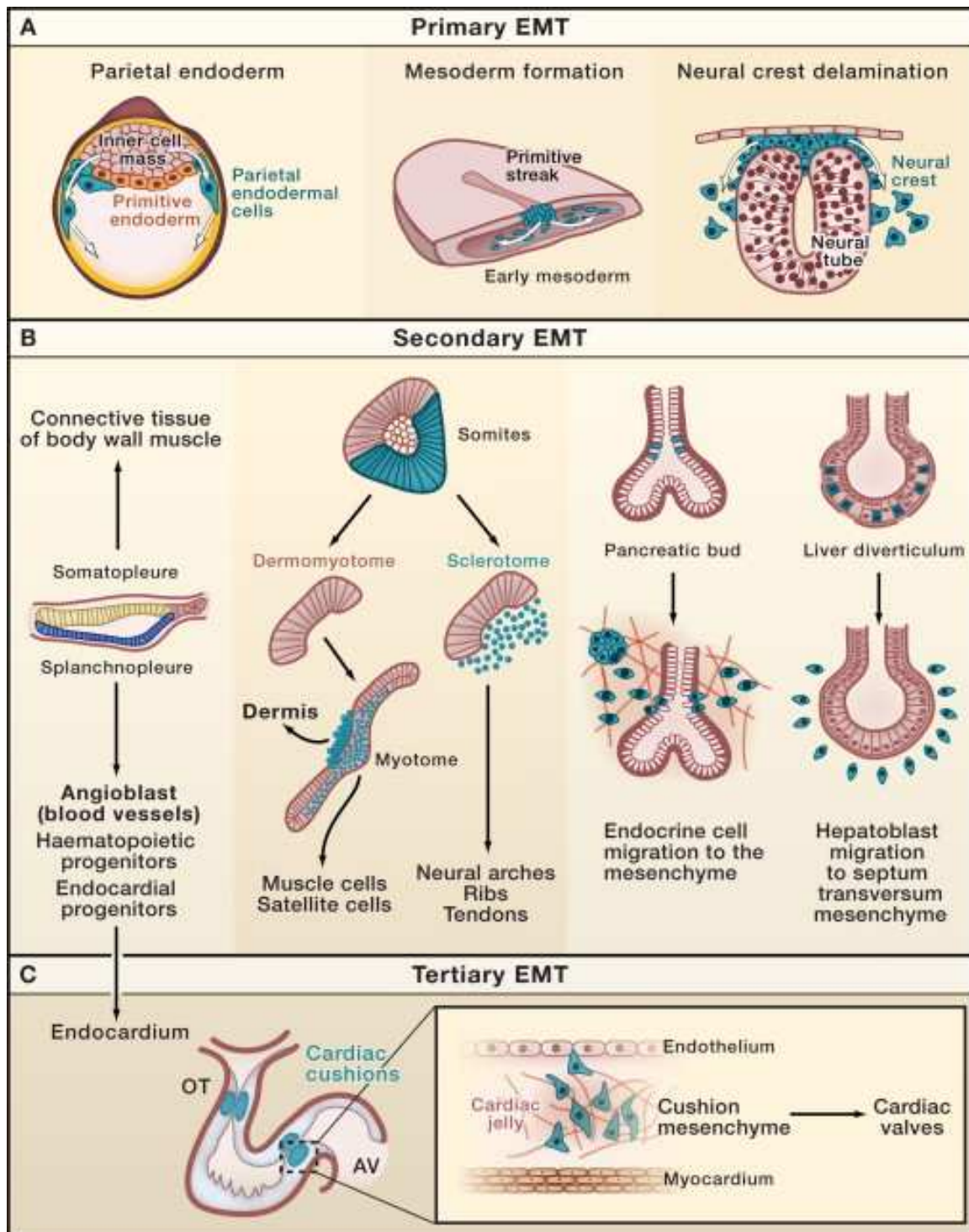


Figure 18 : Contextes embryonnaires de l'EMT de type 1.

D'après (Thierry, J.P. *et al.* ; 2009) [138]

(A) Les cellules mésenchymateuses primaires sont issues de la transition de tissu n'ayant jamais subi d'EMT et provenant directement des blastomères. Elles sont largement pluripotentes et se retrouvent dans le trophoblaste des mammifères, le mésoderme de tous les métazoaires triblastiques et les crêtes neurales des vertébrés. (B, C) Les EMTs secondaires et tertiaires dépendent de la ré-épithélialisation de cellules ayant subi un premier cycle transitionnel. Elles participent à l'angiogenèse (*blood vessels*), l'hématopoïèse (*Haematopoietic progenitors*) et la formation des valves endocardiaques (*Endocardial progenitors et Endocardium*): transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT). Les somites subissent également une délamination au cours de la mise en place du dermomyotome qui permet la formation des muscles squelettiques, du derme et de l'épiderme. Enfin, une migration des cellules épithéliales associée à une perte de cohésion a été décrite dans la fermeture du palais et l'organogenèse des structures tubulaires (*Pancreatic bud, Liver diverticulum...*).

# EMT processes during vertebrate embryonic development

Process	Epithelium of origin	Newly formed mesenchymal tissue	Derivatives	Refs.
<b>Primary EMT</b>				
Gastrulation (EMT at the primitive streak)	Epiblast	Axial mesoderm	Embryonic notochord	105
		Paraxial mesoderm (somites)	Skeletal muscles, bones, tendons, satellite cells, components of vertebrae and ribs, vertebral arteries	
		Intermediate mesoderm	Urogenital system	
		Lateral plate mesoderm	Cardiac cells, mesenteries, and peritoneal cells, conjunctive tissue of the body wall, blood vessels, HSCs	
		Endoderm	Digestive and respiratory tract	
Neural crest formation	Dorsal neural tube	Neural crest mesenchyme	Neurons of peripheral nervous system; glial cells; pigment cells; endocrine cells of the adrenal medulla and C cells of the thyroid; facial cartilage and bone; odontoblasts; dermis; connective tissue of cranial muscles and salivary, lachrymal, thymus, thyroid, and pituitary glands; meninges of the forebrain; smooth muscle and adipose tissue of skin, head, and neck; VSMCs	106
<b>Secondary EMT</b>				
Somite decondensation	Ventral half of the somite	Sclerotome	Neural arches, ribs, syndetome, vertebral body, intervertebral discs, endothelial cells, tendons, meninges of the spinal cord, blood vessels, vertebral joints, perineurium, endoneurium	107
	Dorsal part of the somite	Myotome	Satellite cells, smooth muscle	108
Lateral plate mesoderm	Somatopleure	Mesenchymal cells	Connective tissues of limbs, body wall muscles	109
	Splanchnopleure	Angioblasts	Blood vessels	110
		HSCs	Blood cells	111
		Endocardial progenitors	Heart cells	
Secondary palate	Palatal shelf	Palatal mesenchymal cells	Sertoli cells	112
Pancreas	Pancreatic bud	Endocrine cells	Palatal closure	113
Liver	Liver diverticulum	Hepatoblast	Endocrine cells of Langerhans islets	14
			Hepatocytes	15
<b>Tertiary EMT</b>				
Cardiac valve formation	Cardiac endothelium	Cardiac cushions	Cardiac valves	114

**Tableau 4 : Contextes embryonnaires et tissus dérivés de l'EMT de type 1.**

D'après (Acloque, H. *et al.* ; 2009) [131]

Les EMT de type 1 peuvent dériver de tissus épithéliaux primaires, secondaires ou tertiaires avec, à chaque cycle transitionnel, une perte de la pluripotence et du nombre de dérivés tissulaires possibles à partir d'une même cellule. Les cellules du mésoderme (issues d'une EMT primaire) sont à l'origine de tout le système osseux et musculaire, la colonne vertébrale, le système cardio-vasculaire et uro-génital et les séreuses conjonctives de tous les organes internes. De même, les cellules mésenchymateuses primaires des crêtes neurales peuvent donner naissance à des descendants très divers et de multiples lignages (mélanocytes, cellules endocrines, adipocytes, myocytes et chondrocytes faciaux, cellules des méninges...). A l'inverse, les épithéliums qui induisent une transition secondaire ou tertiaire présentent une perte de leur potentiel de pluripotence et sont déjà engagées vers un état de différenciation. Le myotome, par exemple, est un épithélium unipotent dérivant de l'EMT secondaire dans les somites et participant uniquement à la formation des muscles squelettiques pendant le développement embryonnaire et tout au long de la vie adulte (des cellules du myotome restent quiescentes et demeurent localisées en périphérie des muscles pour permettre une reconstruction tissulaire en cas de lésion (*cellules satellites* : *satellite cells*)). Les numéros dans la colonne de droite correspondent aux travaux ayant permis ces découvertes ; elles sont référencées à la fin du manuscrit dont est extrait ce tableau :

Acloque, H., *et al.* ; *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. The Journal of clinical investigation ; 2009. **119**(6): p. 1438.



## 2 - Cicatrisation et fibroses (type 2)

L'EMT de type 2 est associée aux phénomènes de cicatrisation et de régénération tissulaire ainsi qu'aux pathologies fibrotiques.[170-171] Elle est initiée par des signaux moléculaires pro-inflammatoires sécrétés par des cellules inflammatoires (produites en réaction à une lésion) mais aussi des fibroblastes du tissu conjonctif ou encore par des cellules épithéliales elles-mêmes. Ces événements de réparation sont associés à des mécanismes d'EMT très similaires à ceux impliqués dans la formation des tissus embryonnaires mais génèrent des cellules non multipotentes dont la différenciation est très spécifique du tissu lésé. Ce type d'EMT est fréquemment associé à une inflammation transitoire et cesse souvent dès que cette dernière s'atténue. Contrairement à l'EMT de type 1, les cellules qui se ré-épithélialisent reviennent à leur état d'origine sous forme d'un épithélium différencié.

### 2.1. Cicatrisation et régénération tissulaire

La réparation des plaies cutanées est la conséquence de plusieurs processus finement coordonnés associant l'inflammation, la coagulation, la migration des **kératinocytes** (ré-épithélialisation), le remodelage de la membrane basale et de la MEC ainsi que des étapes de maturation du derme et de l'épiderme. C'est au cours de l'étape de ré-épithélialisation cutanée que l'on peut observer plusieurs similitudes aux plans morphologique et moléculaire avec les phases de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et mésenchymo-épithéliale (MET) décrites durant le développement embryonnaire. Au niveau du foyer de blessure, la pression des médiateurs de l'inflammation produits lors de l'agression tissulaire va conduire à une activation des fibroblastes conjonctifs qui vont synthétiser de la matrice extracellulaire et induire une contraction de la zone tissulaire altérée pour permettre le rapprochement des zones saines. Les kératinocytes au contact de ces zones vont alors subir une EMT partielle associée à une prolifération active et une migration permettant de régénérer le tissu altéré. Si l'agression persiste, l'inflammation chronique et les phases de réparation répétées vont favoriser l'accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire (acide hyaluronique, fibronectine, collagènes interstitiels, protéoglycanes) et constituer une cicatrice permanente.[172-173]

### 2.2. Fibroses

Le processus de cicatrisation mis en place qui conduit normalement à la reconstitution du tissu altéré peut également aboutir à la production en excès de tissu conjonctif qui va alors progressivement remplacer le tissu originel et générer une dysfonction organique. Le rôle de l'EMT au cours de pathologies aboutissant à la fibrose devient de plus en plus évident, non seulement dans le **rein**, de loin l'organe le plus étudié, mais aussi dans d'autres organes possédant une organisation de type tubulo-lobulaire : le poumon, le foie et la glande mammaire.[174-175]. Dans certains cas particuliers, la fibrose peut se prolonger dans le temps et donner naissance à une réponse à une **inflammation** continue, ce qui peut finalement mener à la destruction de l'organe ou à une transformation tumorale.[176-178]

### 3 - Relevance de l'EMT dans la tumorigenèse (type 3)

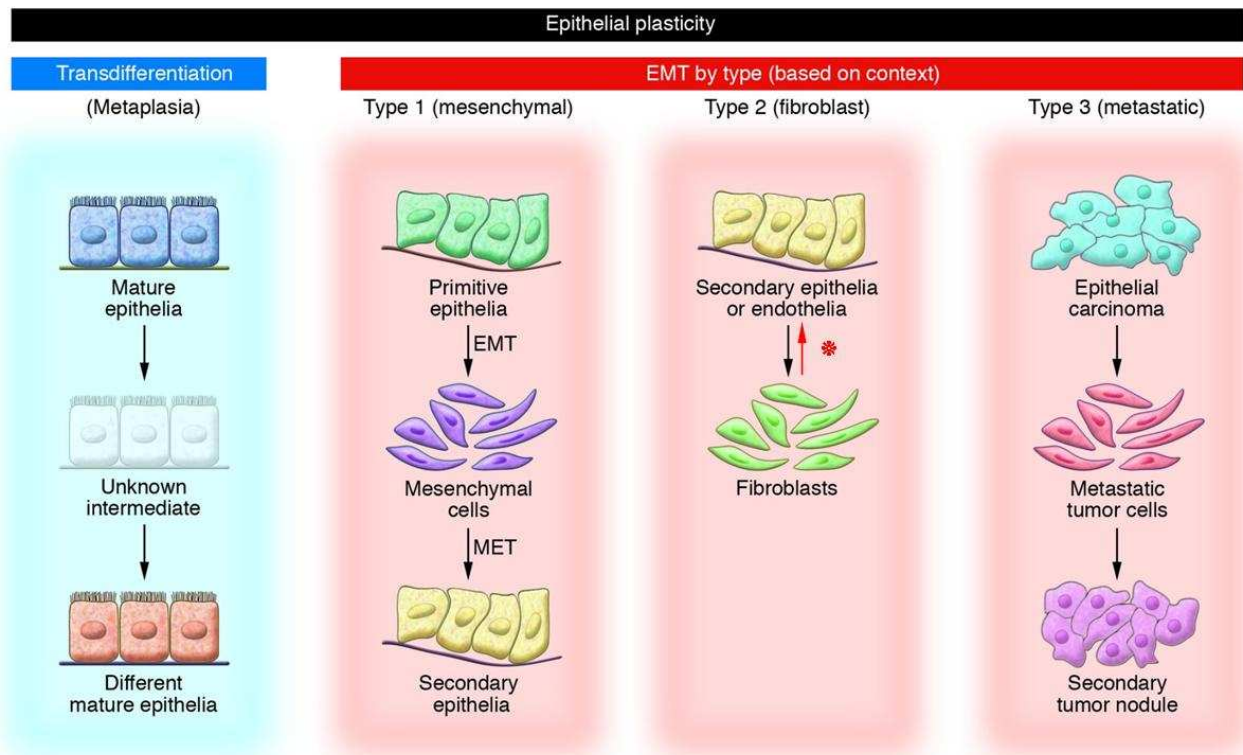
L'EMT de type 3 se présente dans le contexte de la progression tumorale et l'**invasion métastatique**. Elle concerne les cellules néoplasiques qui ont, pour la plupart, déjà perdu un certain nombre de caractéristiques typiquement épithéliales et arborent de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques, notamment dans l'expression des oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeur. Malgré ce contexte cellulaire très différent, il semble que les voies de signalisation et les gènes impliqués dans cette «EMT oncogénique» présentent de nombreuses similitudes avec les mécanismes intervenant dans la dispersion des cellules épithéliales primaires au cours de l'embryogenèse.[129, 179] Ainsi, les «programmes canoniques de l'EMT» pourraient être réactivés dans des circonstances où la migration devient nécessaire pour les cellules tumorales, ceux-ci se croisant avec les «programmes oncogéniques», donnant naissance à des phénotypes très particuliers et probablement dépendants du type de mutations rencontrées ou de l'environnement intra et extracellulaire.[138] Même si les preuves expérimentales et cliniques s'accumulent, les différents rôles de l'EMT dans les processus métastatiques sont actuellement très controversés et font l'objet de nombreux débats entre les pathologistes et les chercheurs, en particulier à cause du manque d'évidences directes chez l'être humain.[180-185] L'EMT de type 3 peut également être décrite sous les termes de «pseudo-EMT» ou «EMT-like», en accord avec le concept de réactivation de programmes physiologiques dans des contextes pathologiques très particuliers.[128] A ce jour, la perte de cohésion cellulaire dans les carcinomes a été décrite comme participant à l'invasion métastatique, la formation du stroma tumoral, la résistance aux agents génotoxiques et le maintien des «cellules souches tumorales» (*cf. partie D*) Dans le chapitre IV, nous nous intéresserons plus particulièrement aux processus métastatiques intervenant dans la progression des adénocarcinomes de la glande mammaire (carcinomes ducto-lobulaires infiltrants).

### 4 - EMT dans les lignées cellulaires

Un grand nombre des mécanismes cellulaires de l'EMT ont été validés dans des lignées de laboratoire sans être forcément associés à des observations *in vivo*. En culture *in vitro*, il est admis que ces lignées cellulaires, même non transformées, ont un taux de mutation très élevé et un environnement moléculaire souvent très éloigné de celui des cellules épithéliales qui composent notre organisme. Il est donc très probable que, sous l'induction d'une EMT, de telles cellules puissent générer des phénotypes nouveaux associés à des voies de signalisation dépendantes de ces éléments spécifiques (comme c'est le cas pour les cellules néoplasiques).

Un autre élément important est la contribution des éléments du cytosquelette et de la MEC dans l'acquisition de la motilité cellulaire par les cellules cohésives. Les cellules en culture «classique» (culture en deux dimensions) sont beaucoup plus étalées afin d'occuper la surface maximale de la boîte de Pétri et les contraintes mécaniques qui s'exercent sur le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire n'ont rien à voir avec celles qui peuvent exister au sein d'un épithélium *in vivo*. Des études récentes démontrent que ces contraintes sont capables de moduler et même d'activer un certain nombre de voies de signalisation, ce qui pourrait également contribuer à la régulation de l'EMT dans les modèles cellulaires *in vitro*. [186-189] Le rôle physiologique ou pathologique de l'implication de certaines de ces voies de signalisation n'étant

actuellement pas clair, il pourrait être raisonnable d'adopter une nouvelle classe de «type 4» ; les termes «pseudo-EMT» et «EMT-like» conviennent également pour la description de ces phénotypes originaux.[128]



**Figure 19 : Plasticité des tissus épithéliaux.**  
Modifié d'après (Zeisberg, M. *et al.* ; 2009) [124]

La métaplasie représente un état de transdifférenciation entre deux types d'épithéliums et n'implique pas d'état transitoire sous la forme d'une cellule mésenchymateuse ou d'un fibroblaste. Un modèle récent propose de classer la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) en trois sous-types différents selon le contexte biologique dans lequel elle apparaît. Les EMT de type 1 concernent tous les processus décrits dans l'embryogenèse, particulièrement lors de la gastrulation et du développement de la crête neurale. Elles aboutissent à la production de cellules mésenchymateuses multipotentes capables de former de multiples tissus épithéliaux secondaires par MET (transition mésenchymo-épithéliale). Dans les processus de régénération tissulaire (EMT type 2), les cellules produites sont des fibroblastes différenciés qui semblent revenir sous leur forme «originelle» en l'absence de signaux, sans donner naissance à un nouveau type d'épithélium (\*). Enfin, l'EMT de type 3 se présente dans le contexte de la progression tumorale et l'invasion métastatique. Elle implique les cellules néoplasiques qui ont, pour la plupart, déjà perdu un certain nombre de caractéristiques typiquement épithéliales et arborent de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques. Ces cellules sont capables de rejoindre la circulation sanguine pour diffuser vers des tissus éloignés et former des nodules métastatiques secondaires.

## ***D. Le mythe de la cellule «fibroblastoïde»***

### **1 - Cellule mésenchymateuse ou fibroblaste ?**

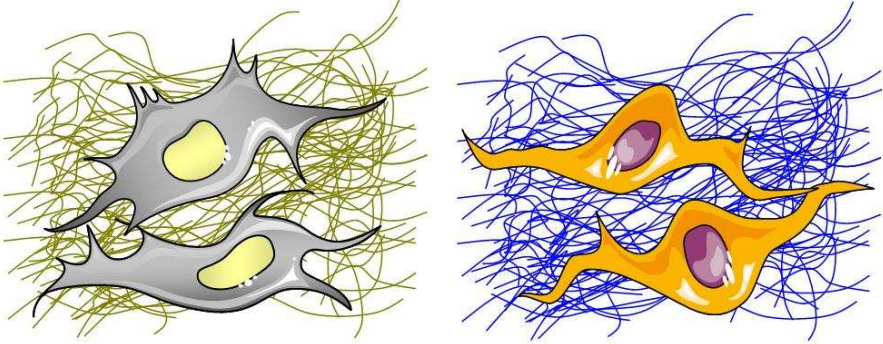
Il est important de distinguer les fibroblastes des cellules mésenchymateuses car si ces deux types cellulaires sont nommés de façon interchangeable dans la littérature, il n'existe pour l'instant aucun lien clair sur un lignage. Les cellules mésenchymateuses primaires sont multipotentes, réceptives à la MET et apparaissent très tôt au cours du développement embryonnaire de tous les métazoaires suite à la gastrulation. Elles sont maintenues dans l'organisme adulte sous la forme de progéniteurs unipotents ou pluripotents confinés dans des zones particulières des tissus différenciés (cellules souches mésenchymateuses).[124, 190-191] L'apparition des premiers fibroblastes conjonctifs est plus tardive et se fait au moment où la plupart des cellules mésenchymateuses issues de l'EMT primaire ont déjà entamé une ré-épithélialisation sous forme d'un épithélium secondaire pour débiter l'organogenèse (au 9ème jour de l'embryogenèse chez la souris : E9). Dans le rein, il a été démontré que les cellules mésenchymateuses en excès sont éliminées par apoptose et ne semblent pas participer à la lignée fibroblastique.[192-193] Des cellules circulantes issues de la moelle osseuse, les fibrocytes, présentent un certain degré de multipotence et peuvent donner naissance à des cellules fibroblastiques et myofibroblastiques.[194] La contribution de ces progéniteurs au pool fibroblastique total varie selon l'organe étudié et il est en fait très probable que les fibroblastes soient issus de plusieurs lignages différents.[195-197] Chez l'adulte, on trouve également des fibroblastes dérivant de cellules épithéliales au cours des processus de régénération tissulaire. Ces lésions peuvent être réversibles ou conduire à la persistance d'un tissu conjonctif sous forme d'une fibrose. Ces «fibroblastes inflammatoires» sont des cellules fortement différenciées et ne semblent pas exister au cours des stades précoces de l'embryogenèse du fait de l'absence de cicatrisation en cas de lésion induite.[198] (*cf. figure 19*)

Dans ce manuscrit, pour les caractéristiques communes ou en l'absence de données permettant de définir l'un ou l'autre de ces types cellulaires, le terme de «cellules fibroblastoïdes» sera utilisé.

### **2 - Caractéristiques des cellules fibroblastoïdes**

Une définition claire des deux types cellulaires est d'autant plus difficile que les fibroblastes (et les cellules mésenchymateuses ?), tout comme les cellules épithéliales, existent sous différentes formes dans l'organisme avec souvent des caractéristiques dépendantes du tissu dans lequel elles évoluent. Chaque organe possède une composition tissulaire et cellulaire particulière et les fibroblastes présents sont spécifiques de l'organe avec une expression variable de molécules actives. De plus, en réponse à différents signaux physiologiques, les fibroblastes changent de phénotype et de fonction et peuvent exprimer de nouvelles protéines spécifiques impliquées par exemple dans le catabolisme du cholestérol ou encore dans les défenses anti-infectieuses (cytokines, récepteurs d'hormones, interféron- $\gamma$ ...).[199-201] L'ensemble des cellules fibroblastoïdes possède tout de même une organisation morphologique commune qui sera décrite sous le terme de «phénotype fibroblastoïde».[124, 202]

Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes ne présentent pas de véritable polarisation cellulaire au repos, ne sont pas associées à l'existence d'une membrane basale et ne forment que localement des adhésions intercellulaires.[203-204] Elles ne forment pas d'amas cellulaires mais peuvent s'adjoindre par l'intermédiaire de cadhérines spécifiques dont le pattern d'expression est variable selon les tissus. D'un point de vue morphologique, les deux types cellulaires présentent une forme aplatie et allongée, avec plusieurs protrusions dont la structure est conditionnée par l'assemblage dynamique de microfilaments d'actine.[203] Le cytosquelette d'actine des cellules fibroblastiques, bien que sous le contrôle des mêmes protéines, est organisé de façon fondamentalement différente en regard de celui des cellules épithéliales. En particulier, le réseau cortical est très mince et ne structure aucune polarité apico-basale ; il permet en revanche d'orienter la position et la forme du noyau dans le cytosol.[205] Dans ces cellules, la plupart des microfilaments d'actine sont organisés sous forme de fibres de stress tendues entre le support matriciel et la membrane plasmique pour permettre à la cellule de réaliser des mouvements de contraction propices à la migration par protrusion / rétraction. (*cf. chapitre III*)



Type cellulaire	Cellule mésenchymateuse primaire	Fibroblaste
Origine	Cellule épithéliale primaire	?
Apparition dans l'embryon murin	E6,5	E9
Morphologie	Fibroblastique	Fibroblastique
Migration	Protrusion – Contraction - Rétraction	Protrusion – Contraction - Rétraction
Cytosquelette	Vimentin, $\alpha$ -SMA, Myosin II, (Fsp-1???)	Vimentin, $\alpha$ -SMA, Myosin II, Fsp-1
MEC	Fibronectin, Collagen I, MMPs	Fibronectin, Collagen I, MMPs
Pluripotence	Élevée (cellules multipotentes)	Faible (cellules différenciées)

**Figure 20 : Comparaison des cellules fibroblastiques et mésenchymateuses primaires.**  
Modifié à partir d'illustrations (Servier Medical Arts), d'après (Zeisberg, M. & Neilson, E.G. ; 2009) [124]

Au niveau moléculaire, il est très difficile de distinguer les cellules mésenchymateuses primaires et les fibroblastes : les deux types cellulaires expriment la vimentine et sécrètent de la fibronectine, du collagène fibrillaire, des protéases et différents facteurs de croissance. L'organisation des complexes migratoires associés au cytosquelette d'actine semble toutefois présenter certaines différences puisque la protéine Fsp1 n'est pas exprimée dans les cellules mésenchymateuses issues de la gastrulation (E6,5). La différence fondamentale entre ces cellules est leur état de différenciation : les fibroblastes sont des cellules très spécialisées fortement différenciées alors que les cellules mésenchymateuses primaires expriment des marqueurs de pluripotence et sont capables de donner naissance à de nombreux types cellulaires.

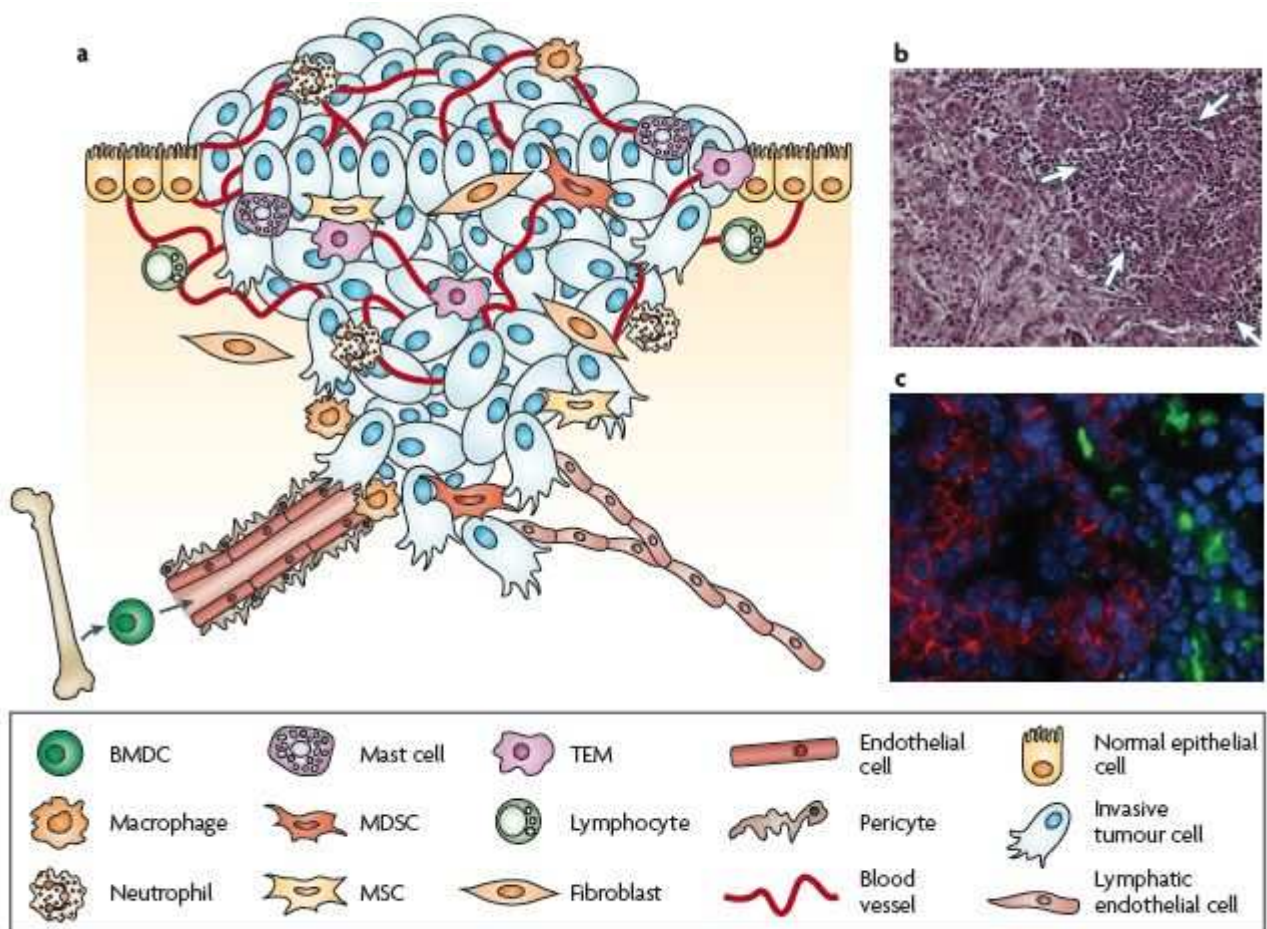
Au niveau moléculaire, il est également très difficile de les distinguer : les deux types cellulaires expriment la vimentine (qui remplace les cytokératines dans les filaments intermédiaires) et sécrètent de la fibronectine, du collagène fibrillaire et différents facteurs de croissance.[8, 206] D'autres protéines sont généralement décrites comme associées aux deux types cellulaires mais leur l'expression dans les cellules mésenchymateuses primaires issues de la gastrulation reste discutable. Par exemple, la protéine S100A4 (*ou FSP1 : Fibroblast Specific Protein 1 ou encore Mts1 : Metastatin1*), un membre de la famille des «S100 calcium binding protéins», est surexprimée dans tous les types fibroblastiques et semble indispensable à leur migration.[207-209] Un élément troublant est l'absence de production de cette protéine dans l'embryon murin avant *E12,5* ; soit plusieurs jours après l'apparition du mésoderme (*E6,5*). Les ARNm encodant la protéine S100A4 sont cependant détectés à partir de *E8,5* soit quelques heures avant l'apparition des premiers fibroblastes. En outre, l'expression de S100A4 n'est pas entièrement spécifique de la lignée fibroblastique et sa répartition tissulaire est très hétérogène.[210-211] C'est le cas également de l'actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA), un marqueur couramment utilisé pour définir les cellules fibroblastiques ou mésenchymateuses.[124, 212] (*cf. figure 20*)

### 3 - Cellules mésenchymateuses et fibroblastiques dans les carcinomes

Le développement d'une tumeur maligne à partir d'une cellule normale s'étend généralement sur une période considérable de la vie, pouvant aller jusqu'à plusieurs décennies, et implique de nombreux facteurs et un processus multi-étapes («Multi-Hits» : accumulation d'altérations).[213] Les tumeurs carcinomateuses avancées sont généralement des tissus composés d'une population hétérogène de cellules ayant des caractéristiques phénotypiques différentes et des potentiels prolifératifs différents. On observe ainsi une organisation hiérarchisée allant de la cellule quiescente et pluripotente (capable de renouveler la tumeur de façon clonale) aux cellules cancéreuses différenciées peu prolifératives en passant par un stade de progéniteurs à prolifération rapide. Ainsi, bien que cette hétérogénéité puisse être considérée comme le résultat de l'accumulation constante de mutations génétiques et épigénétiques (modèle «Multi-Hit»), elle peut également amener l'hypothèse d'un modèle de «tumeur-organe fonctionnant sur des principes d'homéostasie très spécifiques et dont la fonction biologique finale serait l'invasion». Un tel modèle d'«organogenèse oncogénique» suggère que les principes de la biologie s'appliquant aux cellules souches à l'origine des tissus normaux peuvent s'employer pour comprendre comment les tumeurs se développent.[214-216]

Les dérivés *in vivo* de l'EMT de type 3 peuvent être de nature fibroblastique ou mésenchymateuse.[170, 217] Les plus faciles à observer sont de loin les cellules fibroblastiques qui composent le stroma péri-tumoral ; ce sont des cellules différenciées localisées en périphérie de la masse cancéreuse et normalement dépourvues de potentiel métastatique. Le second type de cellules dérivant de cette EMT est beaucoup moins bien connu, il s'agit de cellules mésenchymateuses pouvant présenter des caractères de pluripotence et dont l'apparition au sein de la tumeur est un évènement rare et transitoire, ce qui le rend très difficile à observer. Il semble que ces cellules soient à l'origine de la formation des nodules métastatiques secondaires mais cette notion demeure assez controversée.[129, 218] (*cf. figure 21*)





**Figure 21 : Représentation schématique de la complexité de l'«homéostasie» tumorale.**  
D'après (Joyce, J.A. et al. ; 2008) [215]

Les tumeurs carcinomateuses avancées sont généralement des tissus composés d'une population hétérogène de cellules ayant des caractéristiques phénotypiques différentes et des potentiels prolifératifs différents. Le carcinome peut ainsi être vu comme un «organe invasif ayant acquis un nouvel ordre homéostatique». La majorité des cellules qui composent la tumeur sont des progéniteurs hautement prolifératifs (cellules bleues), ces cellules sont plus ou moins cohésives et tendent à envahir localement le tissu sain ou à rejoindre la circulation sanguine pour constituer des nodules métastatiques secondaires. Les fibroblastes associés (TAFs) peuvent être issus du tissu conjonctif ou être le produit d'une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules néoplasiques. Les cellules souches qui semblent composer les tumeurs sont capables d'auto-renouvellement clonal et présentent des caractéristiques communes avec les cellules mésenchymateuses (MSCs : *Mesenchymal Stem Cells*). Les carcinomes complexes sont également en contact étroit avec de nombreux types cellulaires issus de la moelle osseuse hématopoïétique *BMDCs* : *Bone Marrow-Derived Cells* : péricytes, lymphocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules myéloïdes (MDSCs : *myeloid-derived suppressor cells*), mastocystes (*Mast cells*) et monocytes (*TEM* : *TIE2-Expressing Monocytes*). Les BDMCs semblent également participer à la constitution du pool fibroblastique. Les figures b et c représentent respectivement une coloration hématoxyline-éosine d'un carcinome mammaire (les flèches pointent l'infiltration de leucocytes au niveau du front invasif) et un immunomarquage de la cathepsine B (vert) et de la E-cadhérine (rouge) au niveau du front d'invasion d'une tumeur pancréatique (les noyaux cellulaires sont colorés en bleu par un marquage DAPI).

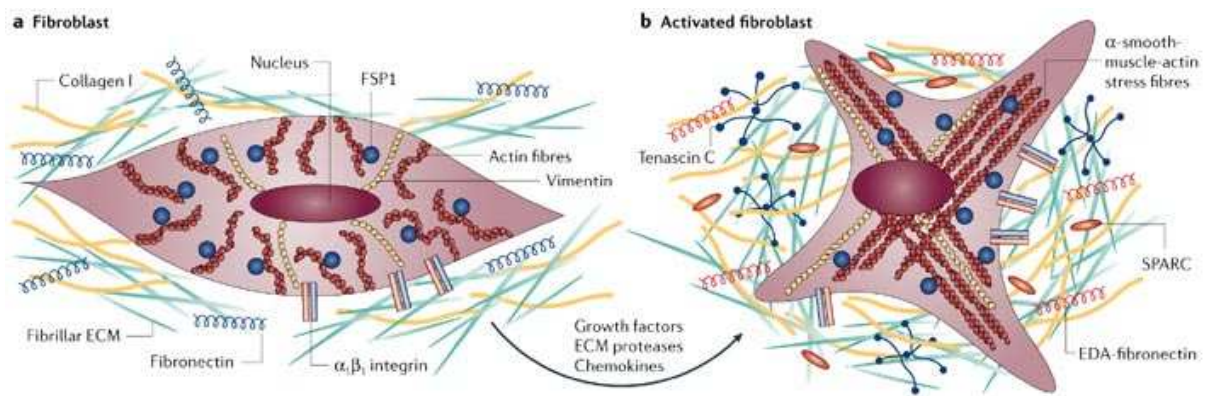
### 3.1. Les fibroblastes de l'environnement tumoral (TAFs)

Les fibroblastes représentent une grande partie des cellules du stroma associé aux carcinomes et subissent des changements dynamiques tout au long de la progression tumorale.[219] Ces cellules ont été largement décrites sous les termes de myofibroblastes péritumoraux (fibroblastes activés), cellules stromales réactives et fibroblastes associés aux carcinomes (**TAFs : Tumor Associated Fibroblasts** / CAFs : Cancer Associated Fibroblasts) ont alors été utilisés pour nommer les fibroblastes associés aux tumeurs et présentant un phénotype particulier. Les fibroblastes associés aux tumeurs ont tendance à proliférer plus vite que les fibroblastes sains et sont généralement doués de capacités migratoires et invasives importantes.[220] Ces cellules expriment l' $\alpha$ -actine ( $\alpha$ -SMA) et la protéine FSP-1 et sont généralement entourés de collagène fibrillaire.[221-222]

Des signaux provenant des cellules cancéreuses modifient le stroma en le rendant plus permissif à la progression tumorale. Les caractéristiques morphologiques des cellules de ce stroma réactionnel ressemblent beaucoup à celles d'un tissu cicatriciel : l'apparition de fibroblastes activés est précoce et semble se faire sous l'influence de signaux provenant du tissu épithélial transformé alors que la membrane basale est encore intacte.[223] Lors de la rupture de cette membrane, la tumeur évolue très vite vers une lésion cancéreuse invasive associée à une prolifération massive des cellules épithéliales. Cette croissance fulgurante génère de nombreuses contraintes, en particulier au niveau de l'apport en nutriments qui doit inévitablement passer par le tissu conjonctif sous-jacent. Une double communication réciproque va s'établir entre le stroma et la masse tumorale entraînant ainsi une augmentation du nombre de cellules inflammatoires et une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui sécrètent des facteurs de croissance, des cytokines et des protéases de digestion de la lame basale, favorisant ainsi l'invasion tissulaire. De plus, des constituants de la matrice peuvent lier des facteurs de croissance, formant des réservoirs mobilisables dès qu'une nouvelle «brèche de prolifération» est ouverte dans le tissu sain.[124, 138] Des études récentes ont montré qu'une part importante des cellules de ce stroma tumoral présentait des altérations génétiques similaires à celles retrouvées dans les cellules plus cohésives du carcinome, suggérant une origine de type EMT pour ces cellules.[202, 224-225] Cette hypothèse est actuellement sujette à controverse et il semble que ces cellules (et les mutations qui les caractérisent) trouvent leur origine dans une fibrose pré-tumorale et ne sont plus produites une fois le caractère tumoral déclaré.[226] (sources : [http://www.avernes.fr/Oncologie/article.php3?id\\_article=1048](http://www.avernes.fr/Oncologie/article.php3?id_article=1048))

Il est également important de noter que ces fibroblastes associés aux tumeurs ne sont normalement pas doués de propriétés métastatiques. Ces cellules sont capables de migrer et de se déplacer à travers la matrice conjonctive et la lame basale et même de rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique par intravasation. Toutefois, leur survie est généralement de courte durée et ne donne pas lieu à la formation de nodules métastatiques secondaires.[227-228] (cf. figure 22)

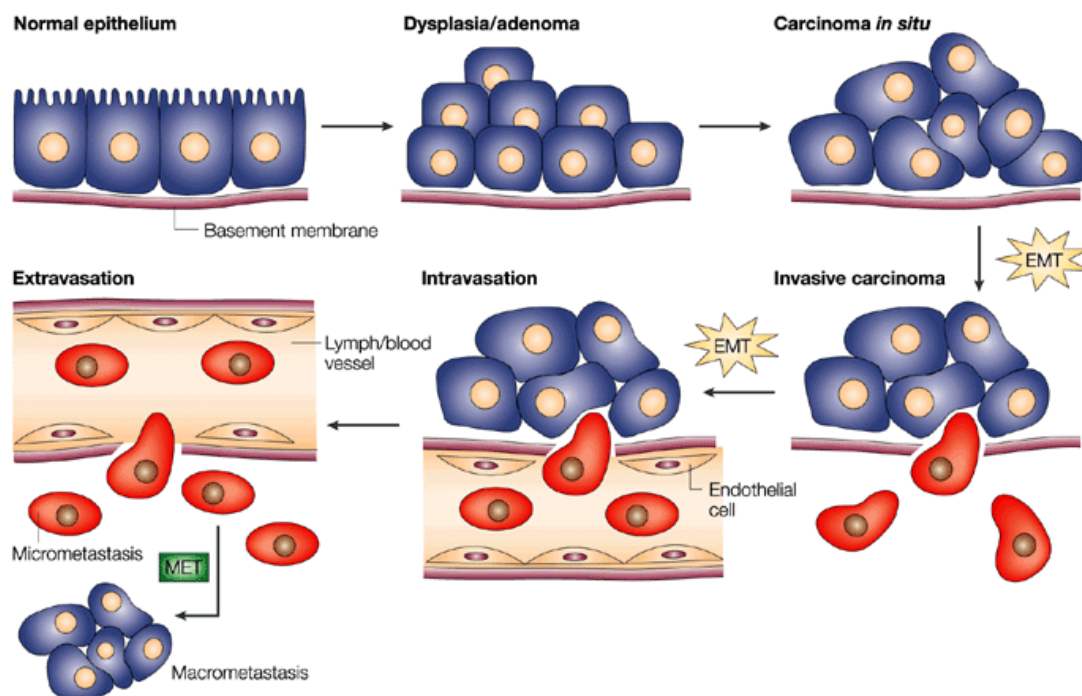




**Figure 22 : comparaison de l'organisation des fibroblastes sains et tumoraux.**

D'après (Kalluri, R. & Zeisberg, M. ; 2006) [222]

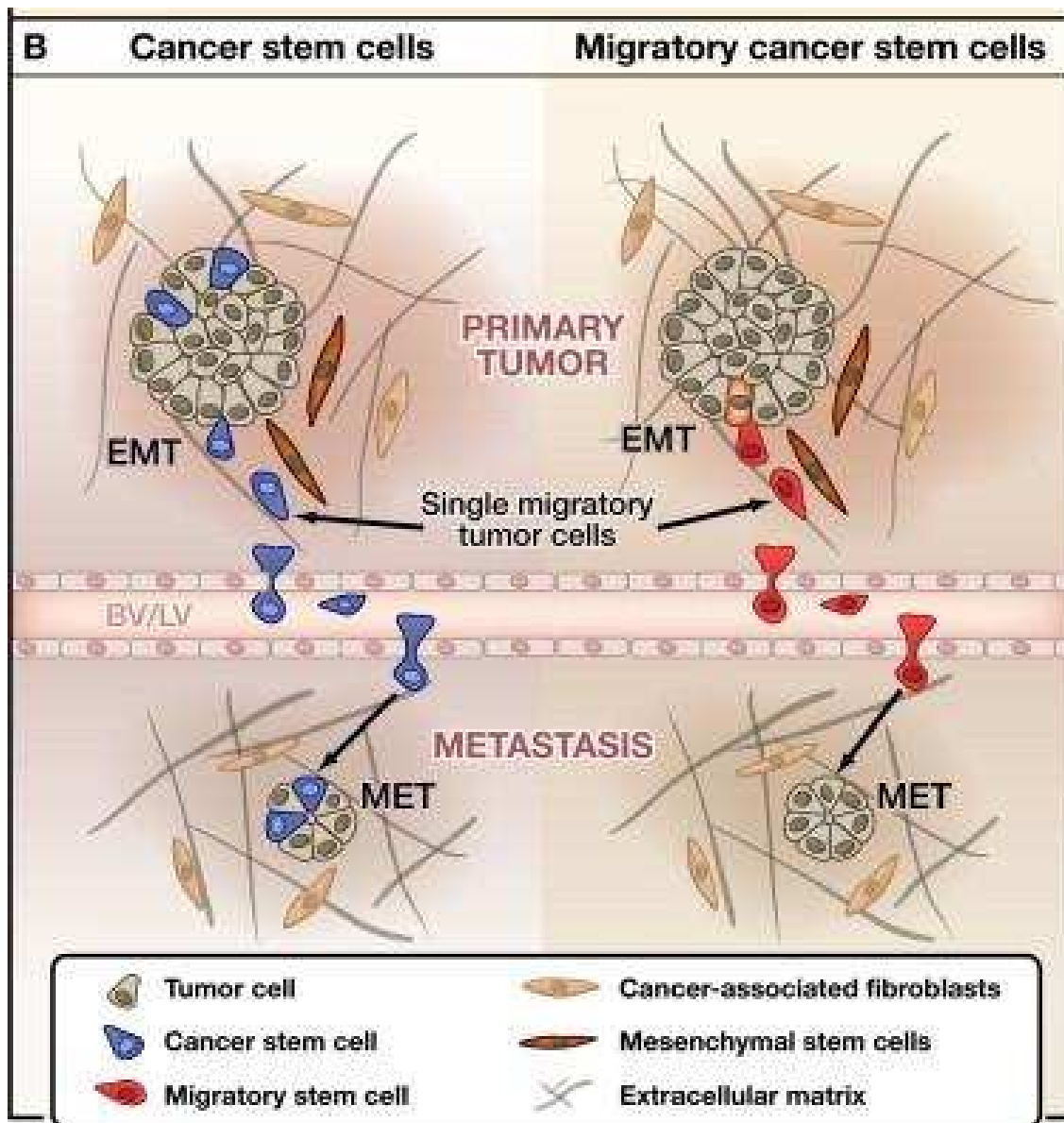
(a) Les fibroblastes non activés des tissus conjonctifs expriment la vimentine et la protéine Fsp-1 ; ils sont entourés d'un stroma peu réactif composé principalement de collagène I et de fibronectine. (b) Les fibroblastes associés aux tumeurs (TAFs) peuvent acquérir un phénotype particulier et sont caractérisés par une prolifération accrue, une augmentation de l'expression de la fibronectine, du collagène I et des protéoglycanes. Ces cellules sont dites « activées », elles sont dotées d'un potentiel invasif élevé grâce à l'expression d' $\alpha$ -SMA, de protéines contractiles et de protéases matricielles spécifiques. Ces fibroblastes modifiés peuvent moduler les interactions entre l'épithélium et le stroma, en particulier par la sécrétion de protéines adaptatrices comme la tenascine C ou SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) et de divers facteurs de croissance (TGF $\beta$ , EGF...), favorisant ainsi la formation de lésions néoplasiques.



**Figure 23 : Evolution du modèle d'implication de l'EMT dans la progression métastatique des carcinomes.**

D'après (Thiery, JP ; 2002) [229]

Selon le modèle initial de l'EMT métastatique dans une tumeur d'expansion clonale, des cellules hautement prolifératives se détachent de la masse tumorale par un processus impliquant des voies de signalisation similaires à celles observées au cours du développement embryonnaire : l'expression de protéases spécifiques permet aux cellules de traverser la lame basale et la paroi endothéliale des vaisseaux afin de gagner la circulation sanguine et migrer vers d'autres organes pour former de nouvelles tumeurs par transition-mésenchymo-épithéliale. Ce modèle simplifié est aujourd'hui très controversé et n'intègre pas la présence éventuelle de cellules souches cancéreuses et les principes d'inefficacité métastatique liés au système immunitaire et à l'apoptose dans le flux sanguin.



**Figure 24 : Modèle revisité de l'EMT métastatique : «l'œuf ou la poule ?»**

*D'après (Thiery, J.P. et al. ; 2009) [138]*

Selon le modèle actuel de l'EMT métastatique, les cellules totalement dissociées capables de diffuser à travers la circulation sanguine ou lymphatique (intravasation) représentent une faible population du carcinome. De plus, la formation de nodules métastatiques secondaires nécessite l'acquisition d'un certain nombre de compétences plus complexes que la dissociation des jonctions ou la formation de faisceaux contractiles. Par exemple, le caractère «souche» de ces cellules semble être un pré-requis pour pouvoir s'installer dans différents environnements tissulaires et reconstituer une tumeur aussi hétérogène que dans le nodule primaire. Une question demeure cependant non résolue : il est difficile d'évaluer la cinétique d'apparition des CSCs (*Cancer Stem Cells*) au sein de la tumeur mais on peut imaginer deux situations. **(Bleu)** Une première hypothèse serait que la tumeur dérive d'une cellule souche ayant accumulé un certain nombre de mutation pro-oncogéniques mais ayant conservé leur potentiel d'auto-renouvellement. Sous l'effet d'un certain nombre de facteurs du microenvironnement tumoral, une telle cellule serait capable de se dupliquer en un nombre limité de clones susceptibles de se détacher pour infiltrer le tissu conjonctif adjacent puis rejoindre la circulation. **(Rouge)** L'émergence du caractère souche peut également être vue comme une conséquence des programmes génétiques et épigénétiques inhérents à l'EMT : la dissociation des jonctions cellulaires, les remodelages du cytosquelette d'actine ou encore les nombreux facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des protéines épithéliales sont potentiellement des éléments de régulation des gènes d'induction et/ou de maintenance de la pluripotence. Enfin, un dernier postulat serait d'attribuer l'origine des CSCs à des altérations génétiques dans des cellules souches saines (*MSCs : Mesenchymal Stem Cells*) ou des fibroblastes qui entreraient dans un processus oncogénique sous l'effet des molécules sécrétées par la tumeur primaire (cytokines, matrice extracellulaire, protéases...). (cellules en marron et beige)

### 3.2. La cellule souche «onco-mésenchymateuse» : mirage ou réalité ?

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité des tumeurs et décrire les cellules à l'origine de la tumeur primitive. Le modèle de «l'expansion clonale», développé par **Fidler** et **Kripke** à la fin des années 70 propose comme origine de la tumeur une cellule somatique différenciée ayant accumulé de multiples mutations génétiques ou épigénétiques lui conférant un potentiel prolifératif illimité.[230-231] Les cellules filles issues de cette cellule mère pourraient à leur tour subir de nombreux remaniements génétiques au fil des générations et sous la pression d'un microenvironnement de plus en plus réactif. Une «sélection naturelle» favoriserait ainsi les cellules les plus adaptées et les plus agressives.[232] Dans ce modèle, une grande partie de ces cellules tumorales serait capable de soutenir la progression métastatique avec des propriétés plus ou moins invasives et des variations dans les capacités de résistance à l'apoptose.[233]

La théorie des «cellules souches tumorales» (**CSC** : *Cancer Stem Cells*) suggère au contraire que la tumeur primitive ait pour origine un petit nombre de cellules souches transformées conservant une capacité de pluripotence et d'auto-renouvellement, permettant ainsi de maintenir une réserve de cellules indifférenciées au sein du «tissu carcinomateux». Les études récentes faisant mention de l'existence de telles cellules dans les tumeurs les décrivent comme présentant des propriétés très similaires aux cellules souches normales de type mésenchymateuses (**MSC** : *Mesenchymal Stem Cell*) et embryonnaires (cellules ES : **ESC** : Embryonic Stem Cells), en particulier l'expression de vimentine et de cadhérine de type N (*CDH2*).[151, 234] De façon intéressante, la reprogrammation de la pluripotence par invalidation génique dans des fibroblastes est également associée à l'expression de ces deux protéines (**IPSc** : *Induced Pluripotent Stem cell*). Toutes ces cellules peuvent également être décrites (et isolées) par des variations subtiles dans l'expression de protéines transmembranaires spécifiques (exemple du profil  $CD44^{high}/CD24^{low}$ ).[138, 217-218, 235-236]

Selon le modèle actuel, les CSCs représentent une faible population cellulaire dans le carcinome ; ces cellules seraient issues de processus d'EMT similaires à ceux observés dans le développement embryonnaire et pourraient être à l'origine de l'invasion métastatique grâce à leur double compétence de motilité et de pluripotence.[128, 237-238] En effet, les cellules métastatiques sont capables de migrer dans le stroma sous-jacent pour rejoindre la circulation sanguine et se déplacer vers des tissus parfois très éloignés dans lesquels elles peuvent redonner naissance à un nouveau «tissu tumoral» selon un schéma très semblable à celui qui a permis le développement de la tumeur initiale.[239-240] Plusieurs études ont également permis de mettre en évidence l'expression par ces cellules de gènes très spécifiques, leur conférant une résistance à la fois au système immunitaire et à différentes drogues anti-tumorales ciblant de façon très agressive les protéines du cycle cellulaire.[241-242] Ce modèle comporte toutefois certaines variantes inhérentes aux différents tissus tumoraux et toutes ces fonctions pourraient être portées par différents progéniteurs plus ou moins spécialisés présents ensemble au sein d'une même tumeur. Ainsi, dans les carcinomes pancréatiques, deux populations de cellules «stem cell like» ont été mises en évidence et semblent se répartir de façon équitable le contrôle de la prolifération de la tumeur primaire et la dispersion métastatique.[243-244] Une meilleure caractérisation de l'existence de ces cellules dans les carcinomes et leur potentielle implication dans les phénomènes de métastases permettra, dans les années à venir, d'amener de nouveaux éléments importants dans la compréhension des mécanismes fondamentaux de la tumorigenèse.[237] (*cf. figures 23 et 24*)

### 3.3. Modèle de la dispersion métastatique

Le terme métastase est issu du grec «*metastasic*» (*changer de place*) et ce phénomène est devenu un objet de recherche dès 1889 avec la publication de l'hypothèse «*seed and soil*» par **Stephen Paget**. [245-246]

Plus d'une centaine d'années plus tard, l'origine des cellules responsables du processus métastatique est toujours une énigme mais de nombreuses avancées ont été effectuées dans la compréhension des étapes nécessaires à la constitution d'une tumeur secondaire. Dans les modèles proposés de l'expansion clonale ou de la cellule souche cancéreuse, les cellules ayant subi une EMT vont migrer pour rejoindre de nouveaux sites de prolifération par une série d'évènements coordonnés mettant en jeu de nombreuses voies de signalisation et divers systèmes de résistance à la mort cellulaire. La formation de nodules secondaires par une cellule qui s'est individualisée de la masse tumorale est en effet un évènement rare qui implique l'acquisition de facteurs de résistance à l'apoptose induite par perte des contacts avec le support d'adhérence (anoïkis), au système immunitaire, à la pression artérielle et éventuellement aux agents anti-prolifératifs utilisés en chimiothérapie.

La croissance prolongée d'un carcinome à l'intérieur d'un tissu sain aboutit généralement à la dégradation de la lame basale, une invasion du stroma conjonctif et le recrutement de cellules endothéliales qui s'assemblent en capillaires «fenêtrés» et constituent un réseau microvasculaire autour de la tumeur. A ce stade, l'«onco-organe» est en contact étroit avec la circulation systémique et la dispersion de cellules par **intravasation** (ou intravasation) est un évènement courant pour de nombreux types cellulaires présents dans ce microenvironnement. (*cf. figures 23 et 24*) La plupart des cellules tumorales circulantes relarguées par une tumeur primitive semblent être apoptotiques et desquamer de manière passive au niveau de l'endothélium sous l'effet du courant sanguin. Ce caractère passif est mis en évidence par le fait qu'un simple massage de la tumeur conduit à une augmentation nette du nombre de cellules tumorales circulantes relâchées par le nodule primaire. [138, 236, 247]

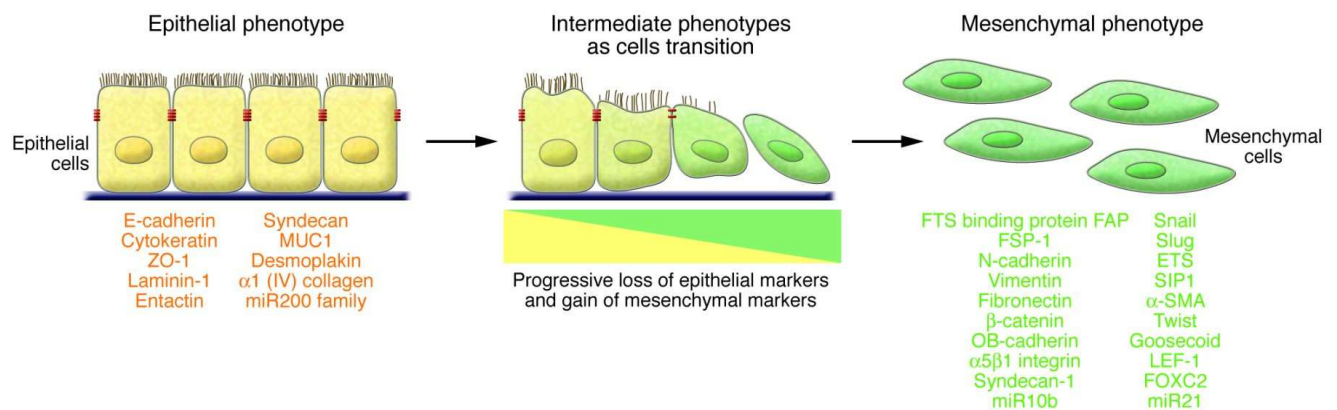
L'intravasation de cellules tumorales viables et susceptibles de former des métastases secondaires serait un évènement beaucoup plus rare, soumis à une migration active et coordonnée. [248-249] La mise en place de modèles d'étude des métastases *in vivo* est donc relativement difficile ; les expériences d'injection intraveineuse de lignées cellulaires hautement métastatiques dans les modèles précliniques murins a permis de démontrer que la probabilité de former des métastases pour chaque cellule tumorale relarguée dans la circulation était relativement faible (aux environs de  $1/10^5$  à  $1/10^6$ ). [250] Cette notion d'«inefficacité métastatique» conduit à penser que la maturation nécessaire à une cellule tumorale pour devenir une cellule métastatique efficace passe par la combinaison de modifications génétiques et épigénétiques ordonnées et spécifiques. De même, l'**extravasation** (sortie de la circulation et reconnaissance de l'organe hôte) semble répondre à des contraintes similaires qui ne permettent pas à une cellule tumorale circulante de s'arrêter et de s'implanter dans n'importe quelle zone de l'organisme. Dans le site secondaire, des interactions spécifiques avec les cellules endothéliales, puis avec le tissu conjonctif, vont permettre ou non la formation d'un nodule métastatique. Ce concept d'**adressage** ou de signature métastatique peut être illustré par l'observation quasi-systématique de métastases pulmonaires puis osseuses dans les phases terminales des adénocarcinomes infiltrants de la glande mammaire. [251-252]



# CHAPITRE III : Effecteurs de l'EMT et composants moléculaires des cellules fibroblastoïdes

## A. Bio-marqueurs de l'EMT

Par définition, l'identification d'une cellule ayant subi une EMT devrait consister à caractériser ses capacités migratoires et donc à observer leur déplacement dans l'organisme. Malheureusement, malgré les progrès fantastiques de la vidéo-microscopie, l'observation *in vivo* des mouvements cellulaires reste un défi non surmonté, en particulier du fait de l'état transitoire de ces phénomènes. L'identification de l'EMT ne peut donc s'effectuer que de manière indirecte par l'étude croisée de l'expression des ARN messagers et des protéines conduisant à l'acquisition du phénotype migratoire. A ce jour, le «transcriptome» et le «protéome» de l'EMT sont très incomplets mais déjà relativement vastes : au moins 25 protéines sont surexprimées, une dizaine est réprimée et on compte au moins une centaine de modifications épigénétiques, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Il existe de nombreux marqueurs possibles pour décrire les cellules au cours de l'EMT, cependant, malgré l'accumulation de données, il est très difficile de définir précisément un ou plusieurs «bio-marqueurs de l'EMT» dont l'expression serait modulée de la même façon dans tous les systèmes mis en jeu. Pour l'instant, il est impossible d'établir de façon fiable une standardisation des critères de cette transition cellulaire et plusieurs marqueurs décrits dans le paragraphe suivant peuvent être spécifiques de contextes particuliers.[124, 129-130, 253] (cf. tableau 5)



**Figure 25 : Bio-marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.**

D'après (Kalluri, R. & Weinberg, R.A. ; 2009) [129]

Le «transcriptome» et le «protéome» de l'EMT incluent de nombreuses protéines des jonctions intercellulaires (cadhérines classiques et desmosomales, claudines, occludines...) et cellule-matrice (intégrines, laminines, collagènes, fibronectine...), ainsi que des éléments du cytosquelette (cytokératines, vimentine, actine  $\alpha$  du muscle lisse, Fsp-1 / S100A4...). La répression et l'induction de ces protéines est sous le contrôle de facteurs de transcription (Snail, Slug, LEF1, SIP1...), de microARNs régulateurs (mir200, mir10b...) et de diverses modifications post-traductionnelles liées à l'activité de récepteurs transmembranaires sensibles aux cytokines extracellulaires (FGF-R, TGF $\beta$ -R...). Les facteurs de transcription et les miRNAs seront abordés le chapitre IV.

Protéines réprimées	Protéines relocalisées	Protéines surexprimées
<b>Protéines membranaires</b>		
E-cadhérine ZO-1 Claudin-1 / 4 Occludines cadhérines desmosomales Intégrine $\alpha 6 \beta 4$ Syndécan-1  Ig-CAMs	E-cadhérine $\beta$ -caténine	N-cadhérine OB-cadhérine   Intégrine $\alpha 5 \beta 1$ Intégrine $\alpha V \beta 6$ FGF-R Ig-CAMs
<b>Cytosquelette</b>		
Cytokératines 5, 6, 18	$\beta$ -actine Myosine II Rho GTPases Tubuline	$\alpha$ -SMA FSP-1 / S100A4 Rho GTPases Vimentine
<b>Protéines sécrétées</b>		
Laminine 1 Collagène type 4  Muc-1		Laminine 5 Collagène type 1 Collagène type 3 Fibronectine MMPs (2, 9...) Fibroblast Activation Protein TGF- $\beta$ , FGF Thrombospondine
<b>Facteurs de transcription</b>		
?	Snail        TCF-1/LEF-1 $\beta$ -caténine Smad 2 / 3	SNAIL / SNAI1 SLUG / SNAI2 SMUC / SNAI3 TWIST 1 / 2 E47 / TCF-3 ID1 / ID2 Ets-1 ZEB1 / $\delta$ EF-1 / TCF-8 ZEB2 / SIP1 / ZFXH1B E2-2(A+B) / TCF-4 TCF-1/LEF-1 FoxC2 Goosecoid
<b>microARNs</b>		
famille mir200 famille Let-7		mir10b mir21 mir661

Tableau 5 : Bio-marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.

## ***B. Destructuration des jonctions intercellulaires***

La perte de la plupart des contacts intercellulaires et des protéines de structuration de la polarité apico-basale est généralement considérée comme un des événements les plus précoces de la migration des cellules épithéliales à travers les tissus embryonnaires ou adultes. Des mécanismes de contrôle très sophistiqués vont ainsi s'opérer à différents niveaux dans le but de réprimer l'expression des protéines des jonctions serrées, adhérentes et desmosomales. Ce système de régulation complexe inclut des systèmes de méthylation de l'ADN, une régulation fine des promoteurs par des facteurs de transcription, un contrôle post-transcriptionnel par des microARNs et de nombreuses modifications post-traductionnelles impliquant en particulier des protéases et des protéine-kinases. Ces modifications des protéines peuvent agir sur la stabilité, la fonction ou encore la localisation des différents composants des jonctions intercellulaires et des protéines du cytosquelette qui leur sont associées.

### **1 - Le «switch» des cadhérines**

#### **1.1. Répression de la E-cadhérine**

Dans les cellules fibroblastoides, il existe des adhésions intercellulaires permettant d'établir des contacts à l'origine d'une communication entre les différents éléments du cytosquelette de cellules voisines. Toutefois, la conversion phénotypique associée à l'acquisition des propriétés migratoires et/ou invasives des cellules épithéliales est généralement associée à la disparition des contacts les plus renforcés. La répression transcriptionnelle de la E-cadhérine est sans doute la caractéristique la mieux décrite dans la littérature actuelle ; c'est également le mécanisme le plus conservé dans les différents contextes d'EMT et sa ré-expression est également typique du processus de transition-mésenchymo-épithéliale.[254] Le taux de synthèse de cette protéine est sous la dépendance de la régulation du promoteur du gène *CDH1* via des mécanismes complexes faisant intervenir des protéines de méthylation des îlots CpG et de nombreux facteurs de transcription qui seront décrits dans le chapitre IV.[69, 255-259]

La E-cadhérine est considérée comme un suppresseur de tumeur et sa répression est un élément initiateur suffisant pour de nombreuses voies de signalisation qui conduisent à l'EMT et/ou à une transformation tumorale dans de nombreux systèmes *in vitro*. [144, 259-262] Dans les cellules épithéliales mammaires HMLE, son extinction par ARN interférence aboutit à la transformation et à l'acquisition de caractères de pluripotence ainsi qu'une résistance à l'apoptose induite par plusieurs drogues chimiques.[263] A l'inverse, une surexpression de la E-cadhérine tend à diminuer, voire à abolir les capacités invasives de plusieurs lignées tumorales.[264-266] D'un point de vue clinique, des formes héréditaires de carcinomes gastriques et colorectaux sont caractérisées par des mutations redondantes ou une hyperméthylation dans le promoteur du gène *CDH1*. [267-270] De nombreuses études immunohistochimiques menées sur des biopsies de tumeurs ont également démontré que la perte d'expression de la E-cadhérine dans les tumeurs est corrélée à l'invasivité tumorale, à la présence de métastases, et à la mortalité des patients.[262, 271] L'»EMT



métastatique» peut également être associée à la perte de fonction, la dégradation ou la relocalisation de la E-cadhérine par une accumulation de modifications post-traductionnelles ectopiques sous l'effet de mutations dans la partie codante du gène *CDH1*. [272] La protéine est également l'objet de processus de dégradation par les MMPs et il est probable que les domaines libres issus de ce clivage (domaines extracellulaire EC1 et intracellulaire) puissent participer à la régulation de l'invasion tissulaire. [273-275] Enfin, certaines publications rapportent une relation inverse entre expression de la E-Cadhérine et potentiel d'intravasation et de dispersion métastatique. [144, 261, 276]

Il est important de noter que le rôle de la E-Cadhérine ne se limite pas à la seule adhésion intercellulaire. Son interaction intracytoplasmique avec la protéine p120 et les caténines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  forme un complexe protéique capable d'initier la polymérisation des microfilaments d'actine et de structurer des réseaux complexes (*cf. chapitre I*). La E-cadhérine est également en relation directe ou indirecte avec de nombreuses voies de signalisation par des interactions avec des protéines cytosoliques (APC, rho GTPases...) et transmembranaires (Wnt, ERBB2, EGF-R, TGF $\beta$ -R....), également impliquées dans les mécanismes d'EMT et/ou d'oncogenèse. [277-278] De telles associations pourraient être à l'origine du rôle de suppresseur d'invasion et/ou de transformation observé dans la plupart des modèles de tumeurs métastatiques et *in vivo*. [279-280]

De façon intéressante, ces divers mécanismes de régulation semblent conservés dans la formation des tissus conjonctifs et cicatriciels et pourraient également jouer un rôle dans de nombreuses étapes du développement embryonnaire. [124] Dans tous les tissus épithéliaux embryonnaires, la perte de la E-cadhérine est en effet un événement qui conditionne la réussite de l'EMT. Les embryons murins déficients pour cette protéine (souris *Cdh1*<sup>-/-</sup>) ne forment pas d'épithéliums fonctionnels et meurent avant l'implantation. La compaction de ces embryons n'est cependant pas affectée, suggérant que la E-cadhérine maternelle est suffisante pour cette étape précoce mais pas pour la formation du blastocyste. [144-145]

La E-cadhérine est exprimée par tous les tissus épithéliaux primaires et secondaires chez la souris y compris dans le neuro-épithélium où elle coexiste avec les cadhérines de type N (*Cdh2*) et K (*Cdh6B*). Au cours de la gastrulation, la perte des jonctions adhérentes doit être très rapide pour permettre une synchronisation de la formation des différents feuillets embryoblastiques et limiter la durée d'action des signaux inducteurs de l'EMT au niveau de la ligne primitive. Ainsi, comme dans le cas des cellules tumorales, la seule régulation transcriptionnelle du promoteur *Cdh1* ne suffit pas à expliquer la rapidité avec laquelle les cellules se dissocient de l'épiblaste. [131, 281] Des criblages pour différentes mutations aléatoires chimio-induites (*induction par l'ENU : N-ethyl N-nitro-sourea*) ont permis d'identifier des embryons présentant des défauts de migration au cours de la «transition épiblasto-mésodermique», sans altération de la régulation épigénétique ou transcriptionnelle du gène *Cdh1*. Les défauts de morphogenèse observés dans la gastrulation de ces embryons semblent en fait dues à des altérations diverses dans des voies de signalisation régulant le trafic intracellulaire et/ou la dégradation de la E-cadhérine au niveau protéique. (p38IP, ARFRP1, produit du gène *Epb4.115*...). [282-284]

## 1.2. Cadhérines surexprimées pendant l'EMT

Les cadhérines majoritairement exprimées par les fibroblastes des tissus conjonctifs normaux et fibrotiques sont les cadhérines de type N (cadhérine Neurale, cadhérine 2, *CDH2*) et OB (cadhérine des OsteoBlastes, *CDH11*).[124, 138] Ces deux molécules peuvent être exprimées en parallèle de la perte de E-cadherine par des cellules épithéliales subissant une EMT mais les mécanismes moléculaires conduisant à leur activation transcriptionnelle demeurent assez mal connus. Les conditions d'expression de ces protéines sont très probablement sous la dépendance de nombreux facteurs transcriptionnels et post-transcriptionnels en relation avec les complexes de répression de la E-cadherine, assurant ainsi une coordination des signalisations aboutissant à ce «switch».

La P-cadherine (*CDH3*) et la N-cadherine (*CDH2*) peuvent être utilisées comme marqueurs des carcinomes mammaires invasifs de haut grade.[285-287] Les cadhérines de type R, K et OB (*CDH4*, 6 et 11) voient leur expression augmenter dans certains carcinomes prostatiques.[288] L'invasion tumorale et les métastases seraient ainsi rendues possibles grâce au passage d'un état pro-adhésif (lié à l'expression de la E-cadherine), à un état pro-migratoire avec expression de cadhérines spécifiques développant des interactions plus faibles et plus permissives à la mobilité.[289-290] Dans les cellules de carcinomes rénaux, une corrélation a pu être mise en évidence entre une expression aberrante de cadherine K (*CDH6*) et un mauvais pronostic.[291]

Au niveau de l'EMT embryonnaire, la N-cadherine est exprimée par les cellules du mésoderme avec la R-cadherine (*CDH4*) de façon inversement proportionnelle à la E-cadherine.[292-293] Dans le système nerveux primitif (tube neural), la N-cadherine participe à la cohésion des cellules neuro-épithéliales et stabilise le pool membranaire de  $\beta$ -caténine. L'EMT intervenant dans la dispersion des cellules des crêtes neurales est associée à une diminution de l'expression de la N-cadherine et une relocalisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Cette différence importante reflète les subtilités moléculaires qui ont lieu au cours de l'EMT dans l'épithélium neural : on observe une répression des cadhérines type E, N, R et K (*CDH6B*) au profit des cadhérines 7 et 11 (OB-cadhérines), plus propices à la dispersion cellulaire.[131, 294] Enfin, la P-cadherine est exprimée dans le mésoderme latéral et les souris déficientes pour cette protéine présentent un développement précoce de la glande mammaire qui demeure fonctionnelle (sécrétion de lait) malgré une hyperplasie de l'épithélium tubulaire et de nombreuses dysplasies.[295-296]

## 2 - Jonctions serrées et desmosomes

Les jonctions serrées et les desmosomes sont responsables d'interactions extrêmement stables mais dont la mise en place dans les tissus épithéliaux est strictement dépendante de l'expression de la E-cadherine et de la mise en place des jonctions adhérentes.[297-299] Ainsi, l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre le domaine EC1 de la E-cadherine empêche l'assemblage correct de ces structures.[300-301]

Au cours de l'EMT type 1, 2 ou 3, les différentes voies de signalisation qui mènent à la perte de la E-cadherine membranaire vont aboutir d'une part à une répression transcriptionnelle, mais aussi à une relocalisation de la plupart des protéines de la zonula occludens (ZO-1, claudines, JAMs, occludines) souvent associée à leur dégradation par le protéasome.[302-303] Il est intéressant d'observer que dans les

cellules épithéliales rénales (*MDCK : Madin-Darby Canine Kidney*), la répression transcriptionnelle de ZO-1 et de la Claudine 1 est indépendante de l'expression de la E-cadhérine alors que celle de l'occludine y est au contraire directement corrélée.[304] Dans les tumeurs de la glande mammaire, les protéines des jonctions serrées sont considérées comme des onco-suppresseurs capables également d'abolir les métastases corrélées à l'activation d'une EMT de type 3.[305] Le rôle des cadhérines desmosomales (desmoglénines et desmocollines) semble en revanche plus limité dans le sens d'une inhibition du processus métastatique dans les carcinomes épidermoïdes.[306-307] Pour finir, les protéines définissant la polarité apico-basale sont également associées à la «dissociation en chaîne» qui suit la perte membranaire de la E-cadhérine : une inhibition transcriptionnelle des complexes latéraux PATJ/CRUMBS3 et SCRIBBLE/LGL2 ainsi qu'une dégradation protéasome-dépendante des protéines PAR3 et PAR6 ont été décrites dans différents contextes cellulaires d'EMT.[42, 308-312] De plus, l'induction de l'EMT permet de lever l'inhibition exercée par PAR6 sur la E3 ubiquitine-ligase SMURF1, ce qui aboutit à la dégradation de RhoA et donc à la destructuration des «fagots» d'actine latéraux suivie de la perte de la polarité apico-basale.[3, 42]

### 3 - Protéines de la famille des Ig-CAM

La superfamille des immunoglobulines (Ig-CAM : Ig-like Cell Adhesion Molecules) comprend des protéines de un à sept passages transmembranaires développant des interactions homophiles calcium-dépendantes ou au contraire hétérophiles. Elles sont exprimées dans les cellules épithéliales (JAM-1) et endothéliales (V-CAM), les leucocytes (I-CAM) et surtout dans le système nerveux central et périphérique (N-CAM, Nr-CAM, Syn-CAM, L1-CAM...) où elles participent à de nombreuses connexions intercellulaires extrêmement spécifiques. Les cellules fibroblastiques expriment plusieurs de ces protéines pour interagir entre elles (I-CAM : Intercellular CAM) ou avec des éléments de la matrice extracellulaire (H-CAM : Hyaluronic specific CAM, alias CD44).[313] Dans les tumeurs, trois membres de cette famille ont été décrits comme participant aux propriétés invasives : les N-CAM, les Nr-CAM et les L1-CAM. Le rôle de ces protéines adhérentes est complexe et implique une expression spécifique dans certains cancers et une répression dans d'autres modèles. Par exemple, l'expression des protéines Nr-CAM et L1-CAM est corrélée à une accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine dans les mélanomes et les cancers colorectaux mais les ectodomaines de ces protéines sont clivés par les protéases matricielles en même temps que la E-cadhérine.[314-316] Il semble que les produits de clivage de ces molécules puissent agir comme régulateurs pour différentes voies de signalisation, en particulier grâce à une interaction avec les intégrines transmembranaires. De façon intéressante, l'expression ectopique de ces fragments dans des fibroblastes conduit à leur transformation tumorale et à l'activation de propriétés d'invasion.[317] Dans les modèles transgéniques de tumeurs pancréatiques de type  $\beta$ , la perte d'expression de la N-CAM est corrélée à une invasion métastatique importante.[318] A l'inverse, une augmentation de son expression semble corrélée à la diminution de la E-cadhérine dans plusieurs modèles cellulaires tumoraux.[319] Au niveau embryonnaire, le rôle de ces protéines est également très mal connu : les N-CAM participent à la cohésion des cellules nerveuses dès le stade de la plaque neurale et l'EMT intervenant dans la dispersion des cellules des crêtes neurales est associée à une diminution de l'expression de cette molécule.[294, 320-321]

### ***C. Remodelage des filaments intermédiaires : expression de la vimentine***

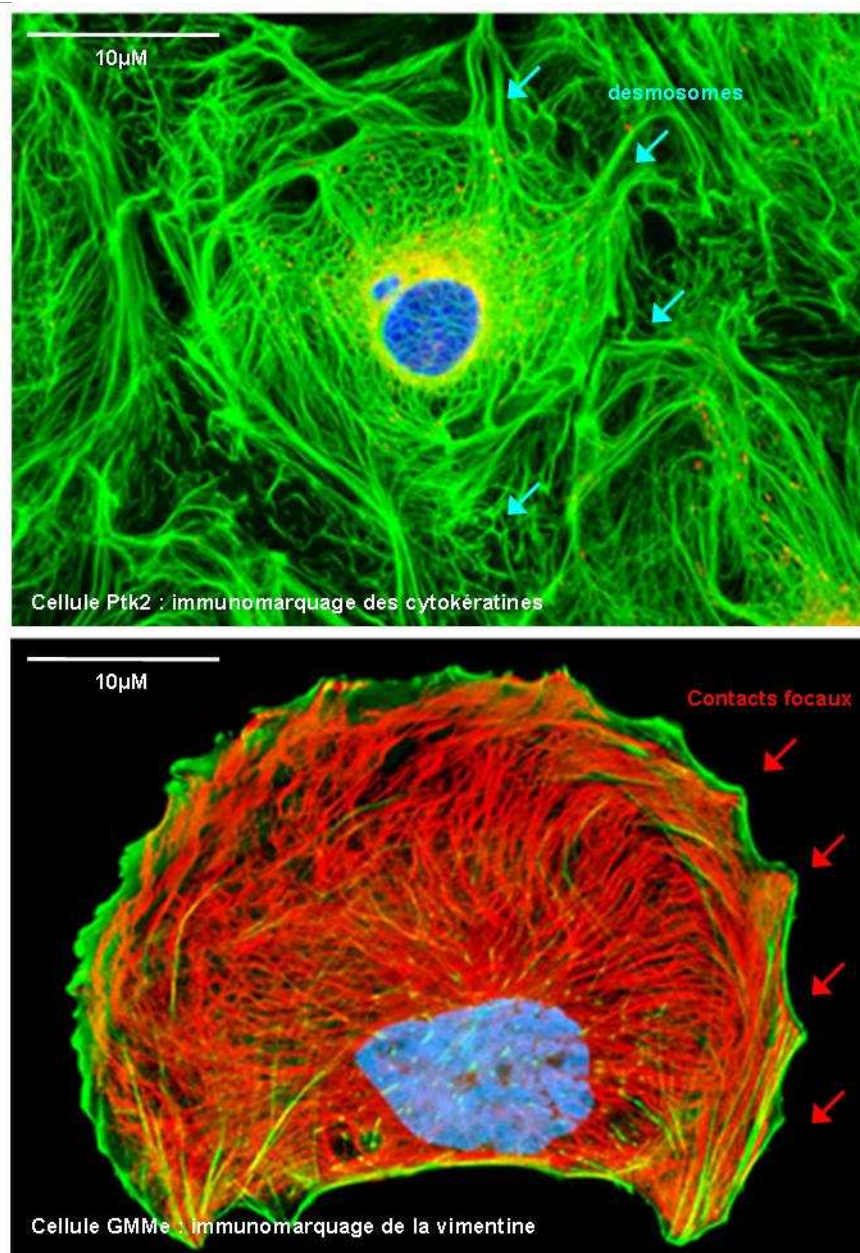
Les fibres de vimentine sont des filaments intermédiaires de type III majoritairement exprimés dans les cellules mésenchymateuses (dès la gastrulation) et les fibroblastes. On en retrouve également dans les cellules endothéliales des réseaux microvasculaires.[322] La structure moléculaire de la vimentine est très semblable à celle des autres filaments intermédiaires (lamine, desmine, GFAP, kératines acides et basiques, neurofilaments) : il existe trois domaines distincts dont une extrémité N-terminale («head domain»), un domaine central relativement bien conservé en hélice- $\alpha$  («rod domain») et une extrémité C-terminale («tail domain») de longueur variable. Ces trois domaines sont porteurs de sites de phosphorylation intervenant dans la régulation de la polymérisation (régulé par les kinases PKC, ROCK, CDK1...).[323] Comme les cytokératines, les filaments de vimentine sont des tubes de 8-10 nm de diamètre constitués d'unités tétramériques formés de deux dimères orientés de façon antiparallèle et interagissant avec le réseau d'actine et les microtubules.[324-325] L'assemblage de ces structures est toutefois plus dynamique que celui des tonofilaments, en particulier grâce à des modifications post-traductionnelles du «tail domain» et à des protéines de régulation spécifiques : les «squiggles».[323, 326]

Dans les cellules fibroblastiques, les filaments de vimentine présentent une organisation radiale dans le cytoplasme et constituent un réseau fibreux autour de l'enveloppe nucléaire, qui s'étend jusqu'à la membrane plasmique au niveau des adhérences focales, grâce à une double interaction avec la laminine et différentes intégrines.[327-330] (*cf. figure 26*)

L'expression de la vimentine est devenue un marqueur par excellence des phénomènes d'EMT dans presque tous les processus physiologiques ou pathologiques associés à une migration épithéliale. La vimentine est exprimée dès la formation du mésoderme et l'invasion du cytotrophoblaste ou la morphogenèse mammaire.[139, 331-333] On la retrouve également dans les cellules fibroblastiques associées à la cicatrisation et à différentes fibroses.[334-335] Les souris déficientes pour la vimentine (souris *Vim* - / -) sont viables mais présentent une réduction du potentiel de cicatrisation associée à une désorganisation des fibroblastes. Les cellules issues des tissus conjonctifs de ces souris possèdent des défauts de migration *in vitro* et *in vivo* avec une organisation aberrante des contacts focaux.[336-337]

L'induction de la vimentine est corrélée à des propriétés migratoires et semble requise pour l'invasion de la matrice dans de nombreuses lignées tumorales *in vitro* (carcinomes mammaires, pulmonaires et prostatiques, mélanomes...).[338-341] Un rôle fonctionnel de la vimentine dans la migration et l'invasion des cellules épithéliales tumorales a également été démontré *in vivo* : la perte d'expression de la vimentine dans des cellules tumorales de la prostate réduit significativement la croissance tumorale après injection sous-cutanée dans des souris athymiques.[342-344] Dans des biopsies de divers carcinomes humains (sein, poumon, ovaire, thyroïde, rein, prostate, peau...), une expression atypique de la vimentine a été observée et semble corrélée à un mauvais pronostic.[341, 345-348]

Il est important de noter que l'apparition de la vimentine est plutôt considérée comme un évènement tardif de l'EMT et que dans les modèles cellulaires, son expression est rarement induite dans les premières phases de dispersion cellulaire précédant la migration directionnelle.[341]



**Figure 26 : Localisation cellulaire des filaments intermédiaires de cytokératines et vimentine.**

Modifié d'après images (Galerie Olympus Fluo view)

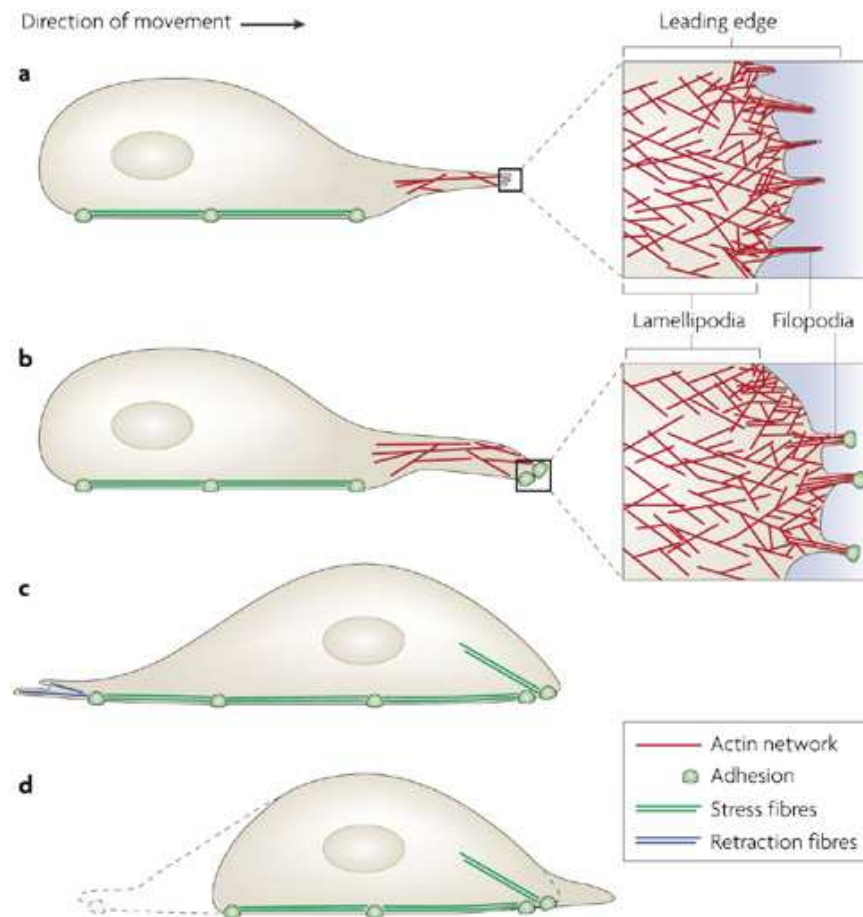
Images de microscopie à fluorescence confocale de cellules **PtK2** (cellules épithéliales rénales de gerbille : *haut*) et **GMMe** ayant induit des changements morphologiques de type EMT (cellules épithéliales utérines de mangouste : *bas*). Les filaments intermédiaires sont visualisés par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre un domaine conservé des **cytokératines** murines et un anticorps secondaire couplé Cy2 (*image du haut, vert*) ou un anti-**vimentine** (également murine) associé à un anti-souris-RedTex et de la phalloïdine-Alexa 488 (*image du bas : rouge et vert, respectivement*). Les noyaux sont marqués en bleu par coloration DAPI. Sur les deux photos, on peut observer que l'organisation des filaments de cytokératine (*haut*) et de vimentine (*bas*) est très similaire avec dispersion radiale à partir du noyau et en direction de la membrane plasmique. Dans les cellules épithéliales, les cytokératines sont ancrées aux desmosomes (flèches bleues) et aux hémidesmosomes alors que la vimentine interagit essentiellement avec les protéines des contacts focaux (flèches rouges).

## ***D. Cytosquelette d'actine et cycles de la migration cellulaire***

### **1 - Modèle général : les cycles d'extension / contraction / rétraction**

L'expression d'un phénotype migratoire permet à une cellule épithéliale de se libérer complètement de son tissu d'origine, c'est la finalité première du processus d'EMT et elle concerne les types 1, 2 et 3. Sous l'effet de la perte membranaire des protéines jonctionnelles, la transition vers un phénotype fibroblastoïde s'accompagne d'une destructuration rapide du cytosquelette d'actine corticale, suivie par une redistribution cytoplasmique des monomères d'actine G et des protéines régulatrices qui leur sont associées. Une réorganisation massive des voies de signalisation conduisant à l'assemblage des macrostructures d'actines va ainsi s'opérer pour aboutir à la formation de larges fibres contractiles propices à la migration : les fibres de stress. Les principaux marqueurs utilisés pour l'observation indirecte de la migration et de l'invasion dans les cellules et tissus fixés sont l'actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA : *Smooth Muscle Actin*), la protéine de liaison au calcium Fsp-1 / S100A4, la phospho-Myosine II, l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , les protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, protéoglycanes, collagènes fibrillaires types I et III) et les protéases qui la dégradent (MMPs, cathepsines, FAP $\alpha$ ...).[349-352]

Pour les fibroblastes (conjonctifs et tumoraux), cet événement correspond à l'étape d'«activation» caractérisée surtout par l'expression d'  $\alpha$ -SMA et l'induction de la myosine II. Les «fibroblastes activés» sont souvent nommés myofibroblastes en raison de leurs propriétés contractiles.[173, 194] Dans les cellules mésenchymateuses primaires, les mécanismes de la migration sont moins bien caractérisés mais semblent se dérouler selon les mêmes principes (à noter que le rôle de liaison du calcium par la protéine S100A4 est probablement suppléé par d'autres molécules dans les cellules entamant une migration avant son expression tardive dans l'embryon : cellules du mésoderme et cellules invasives du trophoblaste). Enfin, la migration des cellules «mésenchymateuses» métastatiques est soumise à des processus mécaniques très similaires mais souvent accompagnés d'une expression accrue des facteurs de dégradation de la matrice extracellulaire qui assurent dans ce cas des rôles très complexes (échappement au système immunitaire, transmission de signaux...).[352-354] Il est important de noter que ces capacités migratoires importantes sont souvent évidentes *in vitro* mais très difficiles à observer *in vivo*.[14, 355] Le système de tension mécanique existant entre la membrane plasmique et la MEC sous l'action des fibres de stress est à la base de la migration cellulaire individuelle par extension / rétraction : dans les modèles utilisant une surface plane, la migration cellulaire correspond à 4 processus ordonnés et répétés de manière cyclique. **(a)** Après adhésion sur un support, la cellule se polarise et émet une protrusion membranaire au niveau frontal (zone vers laquelle la cellule migre). **(b)** Cette protrusion s'étend sous l'effet de la polymérisation de l'actine et adhère au support par des contacts focaux. **(c)** On observe ensuite un déplacement du «corps» cellulaire : le relâchement des mailles du réseau d'actine fait basculer le noyau et le cytoplasme vers l'avant. **(d)** Enfin, la contraction du cytosquelette entraîne la rupture des jonctions cellule-matrice à l'arrière et une rétraction de la membrane plasmique.[356] (*cf. figures 27, 28 et 30*)



**Figure 27 : Organisation des fibres d'actine au cours de la migration cellulaire.**  
D'après (Mattila, P.K. & Lappalainen, P. ; 2008) [356]

Les microfilaments (*actin network*) du front de migration (*leading edge*) sont arrangés de façon parallèle dans les filopodes (*filopodia*) alors qu'ils forment un réseau en mailles dans le lamellipode (*lamellipodia*). Les fibres de stress (*stress fibres*) forment de larges faisceaux contractiles et on observe une dépolymérisation rapide au niveau des fibres de rétraction (*retraction fibres*)

## 2 - Formation du lamellipode

La protrusion frontale est une extension membranaire structurée par un réseau d'actine complexe. Une large extension, le **lamellipode**, s'étend en général sur toute la largeur de la cellule et peut même atteindre plusieurs fois sa taille. Il est organisé autour de microfilaments agencés en mailles et maintenues accolées à la membrane par des molécules de filamine. Le lamellipode est parcouru sur toute sa largeur de fines extensions fortement ancrées à la matrice extracellulaire : les **filopodes** formés de faisceaux parallèles d'actine qui s'assemblent de façon dynamique sous le contrôle de Cdc42 en réponse aux signaux environnementaux diffusibles (chimiotactisme) ou à la déformation mécanique des protéines de la MEC (haptotactisme ou signalisation «outside-in»). Cdc42 active N-WASP qui à son tour régule positivement le complexe Arp2/3, ceci provoquant une augmentation de la nucléation des filaments d'actine. L'activation concomitante de Rac1 permet le recrutement de la filamine et la formation du lamellipode toujours à partir de la nucléation d'Arp2/3. Rac1 va aussi s'associer avec la kinase LIM pour permettre une phosphorylation activatrice de la cofiline conduisant à une dépolymérisation assurant un turn-over rapide des monomères d'actine G et donc à un assemblage rapide du maillage dans le lamellipode.[357] (*cf. figure 27*)



### 3 - Mécanismes moléculaires de la contraction des fibres de stress

#### 3.1. Maturation des contacts focaux et des fibres de stress

L'étape de contraction nécessite l'assemblage et l'activation des myofilaments, composés des fibres de stress et d'un moteur moléculaire (myosine II), dont l'activation est finement régulée par la coordination des structures d'ancrage et des tensions mécaniques qui s'exercent dans la cellule. Les fibres de stress sont de larges faisceaux formés de microfilaments d'actine  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) maintenus parallèles par des dimères d' $\alpha$ -actinine ou de fimbrine.[358-359] En réalité, la dynamique d'assemblage de ces fibres particulières est très complexe et implique de nombreux adaptateurs moléculaires tels que la Plastine T ou la refiline.[360] [Gay, O., Gilquin, B. et al. ; données non publiées]

Le renforcement des fibres de stress est sous la dépendance de la maturation des complexes focaux en **adhérences focales** (ou plaques focales) au niveau des zones de contact entre la membrane et la MEC lâche. L'attachement des filopodes et du lamellipode à la MEC est généralement considéré comme l'élément déclencheur de cette maturation qui débute par le regroupement des intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  et le recrutement de nouveaux adaptateurs moléculaires (paxilline, taline, vinculine...). Cette cascade d'évènements aboutit à la mise en relation des éléments de la MEC et du cytosquelette d'actine sous forme d'un **complexe intégrine-taline-vinculine- $\alpha$ -actinine- $\alpha$ -SMA**. Les fibres contractiles traversent ainsi la cellule de part en part, d'un contact focal à l'autre, ce qui maintient une tension mécanique importante dans l'ensemble du cytosol.[361]

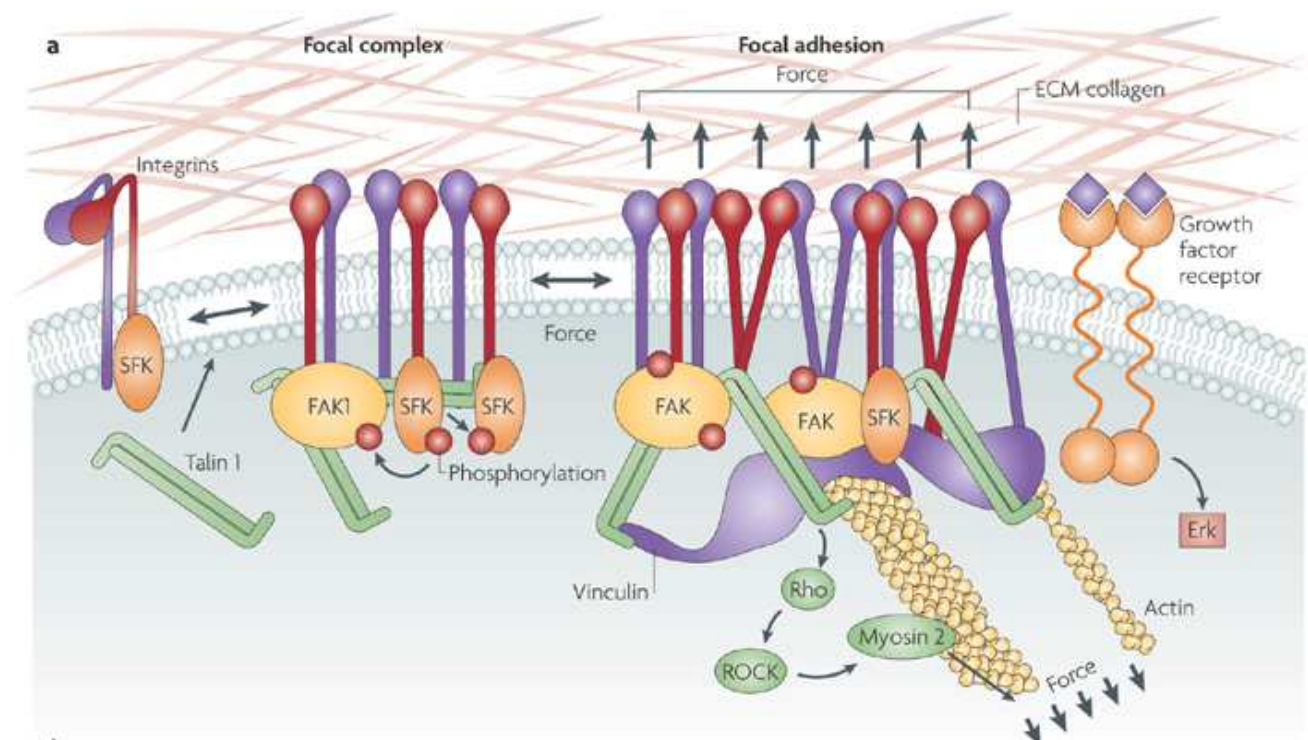
#### 3.2. Cascade d'activation de la Myosine II

*In vitro*, la formation des clusters d'intégrines et des complexes protéiques qui leur sont associés conduit à l'activation de la protéine-kinase **FAK** (*Focal Adhesion Kinase*) par son interaction avec la taline. FAK activée transmet le signal d'adhésion vers la GTP-ase RhoA par l'intermédiaire du facteur d'échange Rho-GEF. RhoA-GTP régule positivement la kinase **ROCK** (*Rho associated protein Kinase*) qui à son tour phosphoryle et inactive la sous-unité MYPT de la phosphatase de la myosine (**MLCP** : *Myosin Light Chain Phosphatase*). [362] Cette cascade de réactions a pour conséquence une augmentation de la phosphorylation de la myosine II par la kinase **MLCK** (*Myosin Light Chain Kinase*). La myosine II ainsi activée s'associe à l'ATP (en présence de calcium) pour engendrer la force de contraction permettant le glissement des filaments d'actine, la contraction des fibres de stress et donc le déplacement de la cellule.[31, 363-364]

La forme active de ROCK est de plus capable d'induire la phosphorylation de la cofiline (ADF : Actin Depolymerizing factor) par la **protéine-kinase LIM** et donc une dépolymérisation locale du cytosquelette d'actine.[38, 365-367] On peut également noter que ces effets très localisés sont en partie dus à une interdépendance forte entre les GTPases Rho puisque l'activité de Rac1 et Cdc42 est directement ou indirectement inhibée par RhoA pendant la formation des faisceaux contractiles. Au contraire, dans le front de migration, on observe une inhibition de RhoA dépendante de Rac1.[368-370] Les deux autres isoformes de RhoA nommées RhoB et RhoC participent de façon similaire à la formation des fibres des stress mais semblent posséder des rôles spécifiques dus à des différences d'affinité pour certains partenaires connus de RhoA impliqués dans la transduction de la signalisation cellulaire associée au cytosquelette.[371] Un autre

élément déterminant dans l'activation des complexes acto-myosine est l'utilisation du calcium permise par des adaptateurs spécifiques de la famille des tropomyosines ou des tropomodulines.[372-373]

La protéine S100A4 (Fsp1) est un peptide de 100 acides aminés possédant deux domaines de liaison pour les cations divalents (domaines «EF hand» : lient  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) et un site de fixation à la partie C-terminale de la chaîne lourde de la myosine II, au niveau d'un site de phosphorylation par PKC (chaîne globulaire qui fixe l'ATP). Son rôle exact dans les cascades de signalisation associées à la contraction est encore mal compris mais ce facteur semble être un élément central de la migration et de l'invasion grâce à une triple interaction avec la myosine, l'actine et la tropomyosine.[210, 374-375] Fsp1 possède également un domaine d'interaction avec les microtubules et des protéine-kinases comme la PKC.[376-377]



**Figure 28 : Maturation des complexes focaux en adhésions focales.**

D'après (Butcher, D.T. *et al.* ; 2009) [361]

La tension mécanique générée au niveau des contacts avec la matrice extracellulaire est perçue par les intégrines qui enclenchent la signalisation "outside-in" à l'origine de la maturation des complexes focaux en adhésions focales et la formation des faisceaux contractiles : ces protéines commencent par oligomériser et former des clusters initiant le recrutement de nombreux adaptateurs moléculaires (taline, p130Cas, vinculine,  $\alpha$ -actinine, paxilline...). La présence des kinases c-Src et FAK permet l'activation de RhoA et donc la formation des fibres de stress et leur contraction sous l'action de la myosine II.

#### 4 - La rétraction membranaire

C'est la conséquence directe de la tension mécanique générée par la contraction des fibres de stress et de la résistance à cette tension offerte par les adhésions. La membrane plasmique atteint ses limites de distension et les contacts de la partie arrière de la cellule, moins résistants, rompent leurs liaisons avec les protéines de la MEC. Un tel processus implique, entre autres, l'internalisation des intégrines et leur recyclage vers l'avant de la cellule.[378-380] L'internalisation des intégrines est responsable de l'activation de la Phospholipase C

(PLC), une enzyme membranaire capable de catalyser l'hydrolyse du **PIP<sub>2</sub>** (*Phosphoinositol-bisphosphate*) en **IP<sub>3</sub>** (*Inositol Triphosphate*). L'IP<sub>3</sub> agit alors comme messenger secondaire de la signalisation «outside-in» pour permettre la libération d'un pool de calcium en provenance du réticulum endoplasmique. L'augmentation locale de la concentration calcique induit une libération membranaire de protéines de dépolymérisation telles que la cofiline, la gelsoline ou la profiline qui permettent le recyclage des monomères d'actine de l'arrière vers le front de migration. Cette dissociation des complexes d'adhésion et des filaments d'actine, associée à l'élasticité membranaire, aboutit à un glissement lent de la cellule vers l'avant, les étapes d'extension et de contraction se poursuivent ensuite en boucle jusqu'à atteinte de la destination.[357, 381-382]

## 5 - Les mouvements amiboïdes

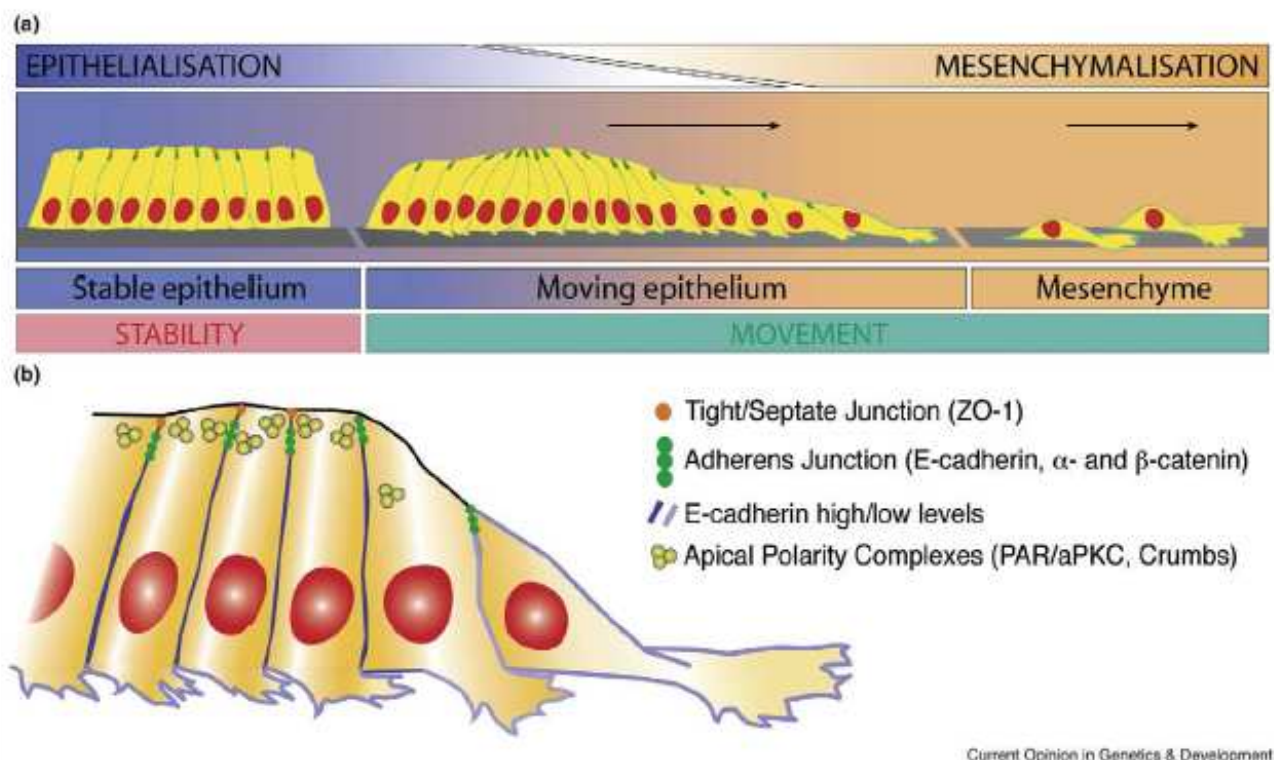
Cette migration amiboïde se caractérise par l'émission d'un **pseudopode** et une transition gel-sol du cytosol sous l'effet d'une destructuration complète du réseau d'actine par la gelsoline. La cellule se déforme pour se «glisser» entre les fibres de collagène de la matrice extracellulaire, sans la dégrader, et le noyau est transloqué d'arrière en avant sous l'effet de l'écoulement cytoplasmique.[383-384] Ce type de déplacement caractéristique des amibes est surtout utilisé *in vivo* par les lymphocytes et les polynucléaires neutrophiles, typiquement lors de leur migration hors des vaisseaux sanguins (extravasation).[385-386] *In vitro*, les lignées tumorales d'origine lymphomateuse ou encore les cellules fibroblastiques issues de carcinomes pulmonaires peuvent utiliser le mouvement amiboïde, en particulier en présence d'inhibiteurs de protéases de la MEC.[387]

## 6 - EMT partielle et migration en chaîne

Un nombre croissant d'observations *in vitro* et *in vivo* a permis de mettre en évidence le fait que la transition épithélio-mésenchymateuse n'était pas toujours un événement complet aboutissant à des cellules totalement individualisées, mais pouvait donner naissance à des phénotypes «intermédiaires» caractérisés par l'expression simultanée de protéines épithéliales et fibroblastiques (**phénotype métastable** ou phénotype «EMT2.0 »).[128, 135-136] Une telle adaptation permet aux cellules à l'arrière du «convoi de migration» d'être automatiquement guidées par les cellules présentes au niveau du front invasif, limitant ainsi la dispersion du groupe et donc la consommation d'énergie lors de la contraction. La perte partielle des marqueurs épithéliaux est également favorable à une synthèse protéique moins importante à la fois pendant l'EMT et la MET. De manière intéressante, des EMTs partielles et totales peuvent être observées simultanément dans un même épithélium, avec une proportion très variable de cellules complètement individualisées.[136, 388] (*cf. figure 29*)

Ce type d'EMT partielle est caractéristique de plusieurs étapes du développement des structures tubulaires telles que les bronches les néphrons rénaux ou les canaux des glandes salivaires et mammaires.[140, 389-390] (*cf. Chapitre IV*) Ce type de migration en monocouche plus ou moins cohésive est également observé

au niveau de l'épiderme, lors de la cicatrisation.[130, 391-392] Pour finir, le phénotype métastable a été décrit comme impliqué dans la progression de certains nombreux carcinomes, en particulier dans la glande mammaire et le rein, il est également possible d'observer une co-expression de la vimentine et des cytokératines dans des cellules isolées en culture ou en immunohistochimie.[128, 393-395] La majeure partie des carcinomes invasifs est ainsi caractérisée par une large hétérogénéité cellulaire, il n'est pas rare d'observer de nombreuses cellules subissant une perte partielle de la E-cadhérine ou des kératines dans plusieurs clones tumoraux.[128, 389, 396] Il est important de noter que l'EMT partielle ne permet normalement pas une intravasation des cellules tumorales au travers de la paroi endothéliale capillaire ; elle peut donc être considérée comme peu propice à l'invasion métastatique et de meilleur pronostic que l'EMT totale.[397-400] Dans la plupart des carcinomes invasifs, la proportion de cellules totalement individualisées est très limitée, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les cellules métastatiques seraient des clones rares, ayant subi des altérations plus importantes que la simple perte de cohésion ou la formation de faisceaux contractiles.[128, 238]



**Figure 29 : Migration collective des cellules épithéliales par EMT partielle.**  
D'après (Revenu, C. & Gilmour, D. ; 2009) [136]

**(a)** Représentation schématique des différents états cellulaires rencontrés au cours de l'EMT : les cellules épithéliales cohérentes peuvent perdre une partie de leurs contacts et de leur polarité pour s'engager vers un phénotype motile intermédiaire qui peut être métastable ou transitoire et se poursuivre par une individualisation complète des cellules. **(b)** Modèle de migration collective dans les tissus épithéliaux : les cellules à l'avant du front de migration perdent la plupart de leurs jonctions serrées (*Tight Junctions*) et protéines de polarité (*Apical Polarity Complexes*) mais conservent des jonctions adhérentes (*Adherens Junctions*) avec une diminution partielle de la E-cadhérine et une faible relocalisation nucléaire des molécules de  $\beta$ -caténine. Ces cellules peuvent également co-exprimer la vimentine et des cytokératines, former des fibres contractiles et établir des adhésions focales par la formation d'un lamellipode. A l'inverse, les cellules à l'arrière du « convoi épithélial » conservent leur polarité apico-basale et leurs contacts avec leurs voisines, tout en relâchant l'ancrage au niveau des hémidesmosomes.

## CHAPITRE IV : Signalisation cellulaire de l'EMT

### A. Cytokines et médiateurs intracellulaires de l'EMT dans la glande mammaire

Les modèles cellulaires et embryonnaires d'EMT couplés à des analyses transcriptomiques et protéomiques dans les tumeurs et les tissus fibrotiques ont permis d'établir une cartographie assez précise des bases moléculaires de l'EMT. Bien que celles-ci ne soient pas encore totalement clarifiées, plusieurs voies de signalisation interconnectées, ainsi qu'un bon nombre de molécules adaptatrices intervenant dans la migration et l'invasion ont été identifiées comme initiateurs de l'EMT, dans les cellules normales ou transformées. Ces cascades d'activations et d'inhibitions protéiques et génétiques sont généralement initiées par des facteurs de croissance qui agissent, entre autres, à travers des récepteurs tyrosine-kinases. Parmi les cytokines modulatrices de l'EMT (et/ou de la MET), on trouve notamment les isoformes du **TGF $\beta$**  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ), l'**EGF** (*Epidermal Growth Factor*), l'**IGF** (*Insulin Growth Factor*), le **FGF** (*Fibroblastic Growth Factor*), le **HGF** (*Hepatocyte Growth Factor*), le **PDGF** (*Platelet-Derived Growth Factor*) et les composants des voies de signalisation **Wnt/ $\beta$ -caténine**, **Hedgehog**, **NF- $\kappa$ B** et **Notch**.

L'EMT peut également être initiée indépendamment de ces facteurs solubles par l'intermédiaire des intégrines ou du cytosquelette d'actine (signalisations «outside-in» et «inside-out») sous l'effet de déformations mécaniques. Les GTPases de la famille Rho assurent une communication entre ces systèmes de mécano-réception et les régulateurs transcriptionnels modulant l'expression des différents bio-marqueurs de l'EMT.[7, 138, 238, 355] (*cf. figure 30*). Enfin, des gènes considérés comme cibles de l'EMT peuvent également agir en tant que modulateurs des processus de transition dans les cellules épithéliales. Ainsi, l'expression ectopique de la métalloprotéinase MMP-3 dans des cellules épithéliales murines est associée à une amplification du potentiel de dispersion et d'invasivité.[355, 401]

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux principaux inducteurs de la signalisation de l'EMT dans les cellules épithéliales mammaires : les voies activées par les récepteurs aux facteurs de croissance (PDGF, EGF, IGF et TGF $\beta$ ) ainsi que la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine (sous l'effet de la formation du complexe Frizzled/Wnt ou de la dissociation des jonctions adhérentes par perte membranaire de la E-cadhérine).

*sources accessibles : Transition Epithélio-Mésenchymateuse : Aspects fondamentaux*

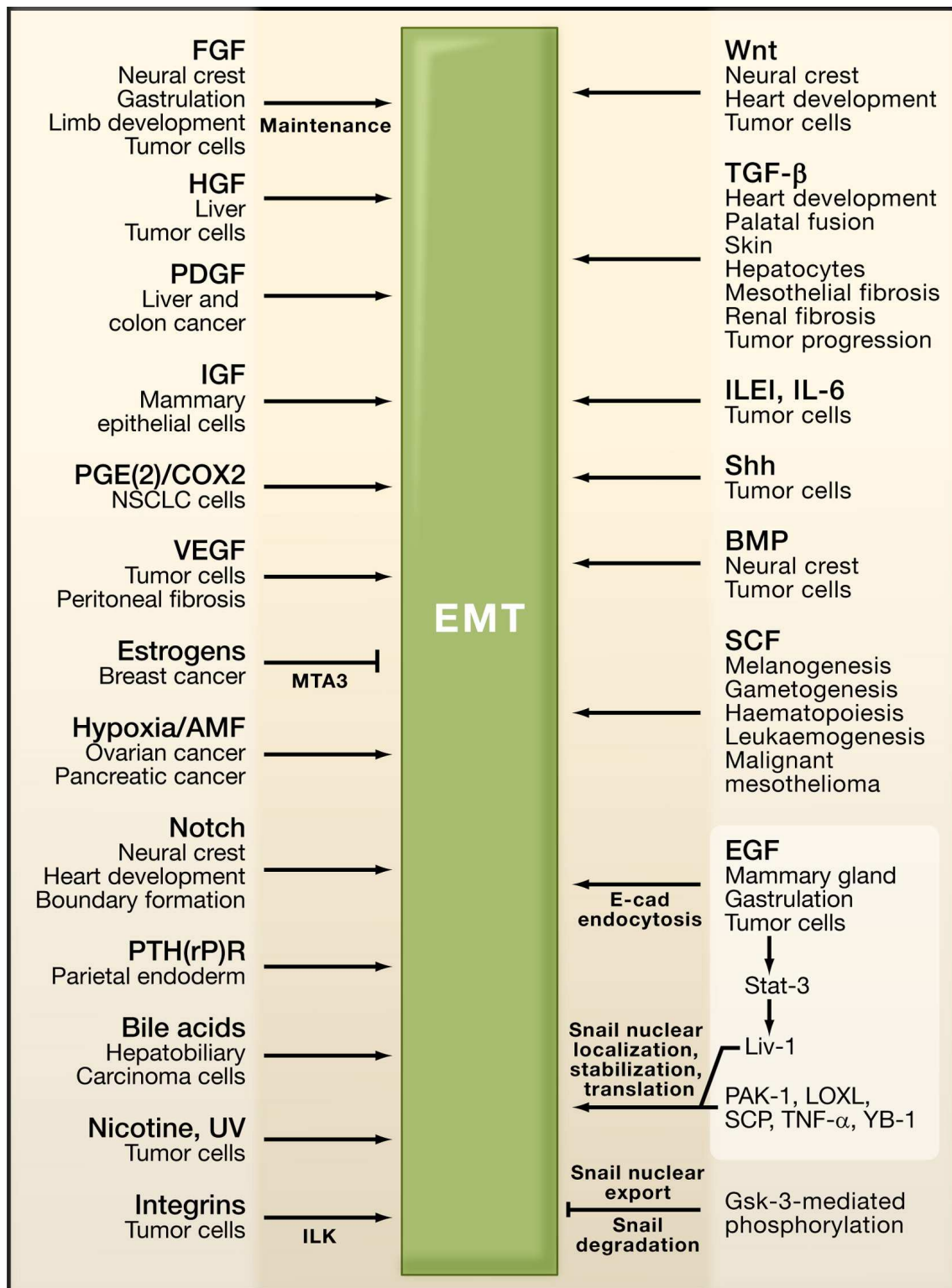
(N. Pallet & D. Anglicheau ; Flammarion Médecine-Sciences, 2008)

<http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-02252010-221121/unrestricted/these.pdf>

[http://www.applis.univ-tours.fr/theses/guillaume.gaud\\_3130.pdf](http://www.applis.univ-tours.fr/theses/guillaume.gaud_3130.pdf)

<http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/39/23/87/PDF/These.pdf>





**Figure 30 : Diversité des voies de signalisation impliquées dans la modulation des gènes de l'EMT.**  
D'après (Thierry, J.P. *et al.* ; 2009) [138]

Une pléthore de voies de signalisation a déjà été identifiée dans les différents contextes d'EMT. Dans la glande mammaire, la morphogenèse des UTDs est sous le contrôle des hormones sexuelles, de cytokines modulant l'activité de récepteurs à activité tyrosine-kinase (EGF-R, IGF-R) et du stroma conjonctif par l'intermédiaire des intégrines. Au cours de la tumorigenèse, ces mêmes signaux peuvent agir de façon non contrôlée (par exemple par des mutations dans la séquence codante des récepteurs ou des molécules de transduction associées) et être responsables d'une évolution métastatique des carcinomes tubulaires et lobulaires. Sous l'effet de cette dérégulation, l'homéostasie de l'épithélium glandulaire est perturbée et de nombreuses molécules peuvent s'ajouter pour amplifier l'altération de la morphologie et de la cohésion des cellules cancéreuses (cytokines de la famille TGFβ et BMP, FGF, PDGF, interleukines, voie Wnt...).

## 1 - La voie Wnt / $\beta$ -caténine

### 1.1. Régulation de la localisation et de la dégradation de la $\beta$ -caténine

En dehors de son rôle de lien entre les jonctions adhérentes (*cf. chapitre 1*), la  $\beta$ -caténine est une molécule «navette» dont le rôle varie en fonction de sa localisation subcellulaire. Ainsi, la  $\beta$ -caténine se répartit dans les cellules en trois «pools» : un pool membranaire, un pool cytoplasmique et un pool nucléaire. Le pool membranaire reliant la E-cadhérine au cytosquelette d'actine via l' $\alpha$ -caténine est unique dans les cellules épithéliales et sa disparition au profit des pools cytoplasmique et nucléaire est couramment utilisée comme marqueur de l'EMT dans divers contextes.[402-404]

Le pool cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine existe dans de nombreux types cellulaires ; il est finement régulé par le système du protéasome.[405] Cette dégradation est sous le contrôle de la formation d'un complexe de destruction multiprotéique qu'elle forme avec l'**axine** et la protéine **APC** (*Adenomatous Polyposis Coli protein*). L'axine lie directement la  $\beta$ -caténine et permet le recrutement des sérine/thréonine-kinases **CK1** (*Casein-Kinase-1*) et **GSK3 $\beta$**  (*Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* ), favorisant ainsi la multi-phosphorylation du domaine N-terminal, en particulier les résidus S<sup>33</sup>, S<sup>37</sup>, T<sup>41</sup> et S<sup>45</sup>. Cette phosphorylation aboutit à la formation d'un motif conservé DS<sup>P</sup>GxxS<sup>P</sup> (xx = variable : IH dans le cas de la  $\beta$ -caténine) reconnu par la E3-ubiquitine-ligase  **$\beta$ -TrCP** ( *$\beta$ -Transducin repeat Containing Protein*). Ceci mène à sa poly-ubiquitination et à sa destruction par le protéasome, ce qui a pour conséquence une limitation de l'accumulation de  $\beta$ -caténine cytoplasmique.[406-410] Cette dégradation peut être empêchée sous le contrôle de la phosphatase PP2A qui déphosphoryle les substrats de CK1 et GSK3 $\beta$ . [410-411] Dans ce cas, la  $\beta$ -caténine libre (c'est-à-dire n'interagissant pas avec les éléments des jonctions adhérentes et n'étant pas dégradée par le protéasome) peut gagner le noyau et alimenter le pool nucléaire. La  $\beta$ -caténine agit alors comme coactivateur des facteurs de transcription de la famille **TCF/LEF** (TCF-1/LEF-1 : *T-Cell specific Factor/ Lymphoid Enhancer binding Factor*) pour réguler l'activité du promoteur de nombreux gènes cibles dont plusieurs bio-marqueurs de l'EMT (c-Myc, SLUG, survivin, MMP7, CD44...).[244, 412-414] (*cf. figure 31*)

La protéine APC est également multi-phosphorylée par les kinases CK1 et GSK3 $\beta$  au niveau d'un cluster de sérines (S<sup>1501</sup>, S<sup>1503</sup>, S<sup>1504</sup>, S<sup>1505</sup>, S<sup>1507</sup> et S<sup>1510</sup>). Le rôle de ces modifications est encore flou mais elles semblent permettre un transport d'APC vers le noyau et renforcer son interaction avec la  $\beta$ -caténine, limitant ainsi la formation de complexes avec des facteurs de transcription. Il n'y a pas de motif DSGxxS (ou DSGxxxS / DSGxxxxS) dans la séquence d'APC, suggérant une régulation indépendante de l'ubiquitine-ligase  $\beta$ -TrCP et de la dégradation de la  $\beta$ -caténine.[415-417]

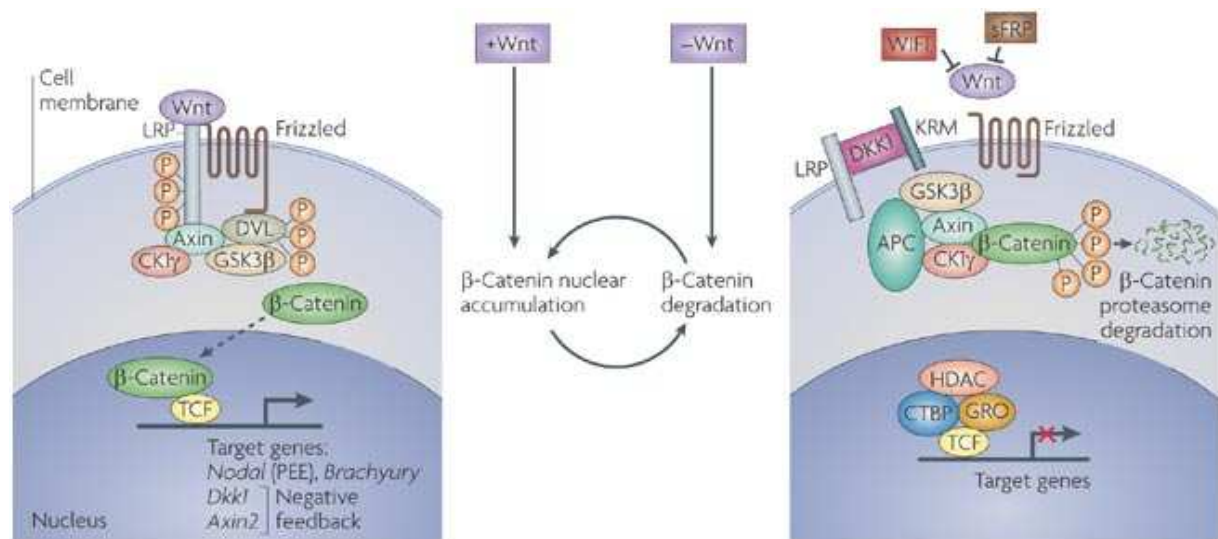
En l'absence de pool nucléaire (cellules épithéliales), TCF-1 agit comme un répresseur en se fixant sur les promoteurs des gènes contenant une séquence LBS (*LEF-Binding Site*) en formant un complexe avec les protéines **Groucho** et **CTBP** (*Carboxy-Terminal Binding Protein*) ainsi que des déacétylases des histones (**HDAC** : *Histones DeAcetylases*). Une telle séquence est présente dans le promoteur de la  $\beta$ -caténine, générant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif.[418] Dans les cellules EMT-induites, la perte d'expression de la E-cadhérine favorise donc une accumulation nucléo-cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et la transcription de gènes associés au complexe TCF/LEF. Une telle relocalisation est considérée comme un des



signes majeurs de l'EMT dans de nombreux contextes biologiques et se trouve sous la dépendance d'un contrôle multiparamétrique.[355]

En plus des contrôles transcriptionnel et post-transcriptionnel qui agissent sur le niveau d'expression de la E-cadhérine, on trouve de nombreuses modifications post-traductionnelles susceptibles de réguler l'intégrité structurale et fonctionnelle des complexes E-cadhérine/caténines/actine. Les interactions entre la  $\beta$ -caténine et ses différents partenaires moléculaires sont régulées en grande partie par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation, impliquant respectivement des kinases et des phosphatases. De manière générale, la phosphorylation des résidus **tyrosine** de la E-cadhérine et des caténines provoque une fragilisation et une dissociation des complexes formés par ces molécules.[419-420] La phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par les kinases SRC, ABL, FER, FYN, EGF-R et HGF-R/c-MET provoque une dissociation des complexes  $\beta$ -caténine/E-cadhérine/ $\alpha$ -caténine.[80, 421-424] La kinase **CK2** joue également un rôle complexe dans la modulation des interactions entre ces protéines : d'un coté, cette enzyme agit avec GSK3 $\beta$  pour phosphoryler la E-cadhérine et favoriser sa liaison à la  $\beta$ -caténine. A l'inverse, sous le contrôle de la MAPKinase ERK, CK2 est capable d'induire la séparation des dimères de caténine ( $\alpha/\beta$ ) et de promouvoir la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et donc la transcription des gènes cibles du complexe TCF/LEF.[425-427]

Parmi les différents mécanismes régulant les fonctions nucléaires de la  $\beta$ -caténine, on distingue en plus des processus de phosphorylation la régulation par des miRNAs, la voie de signalisation Wnt ainsi que tous les mécanismes d'inactivation et de répression de la E-cadhérine.[259, 428-432] (*cf. chapitres IV et V*)



**Figure 31 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine par la voie Wnt et le protéasome.**

D'après (Arnold, S.J. & Robertson, E.J. ; 2009) [433]

**(Gauche)** En présence des ligands Wnt, l'axine est recrutée à la membrane plasmique par le complexe phospho-DVL/Frizzled/LRP et le système de dégradation est inhibé. La  $\beta$ -caténine n'est pas dégradée et peut ainsi s'accumuler dans le cytoplasme. La  $\beta$ -caténine gagne alors le noyau et s'associe aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF, favorisant ainsi la transcription de gènes cibles. **(Droite)** En l'absence de ligands Wnt ou lorsque la E-cadhérine est présente en forte quantité au niveau de la membrane plasmique, la  $\beta$ -caténine est liée à la membrane plasmique et assure l'adhérence cellulaire. Dans le cytoplasme, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée et dégradée par le protéasome sous l'effet de modifications post-traductionnelles impliquant des sérine/thréonine-kinases et des ubiquitine-ligases. Dans le noyau, les complexes TCF/LEF-CTBP-HDAC-GRO (Groucho) répriment des gènes présentant une séquence LBS (*LEF-Binding Site*).

## 1.2. Rôle des ligands Wnt

La dégradation de la  $\beta$ -caténine par le protéasome est largement contrôlée par les ligands de la famille **Wnt** capables de lier les récepteurs transmembranaires, **Fz** (*Frizzled*) et **LRP-5/6** (*Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6*) [434-435] Les Wnt sont une famille de glycoprotéines sécrétées qui interviennent dans de nombreuses étapes du développement embryonnaire et de la morphogenèse. (formation des axes, migration, différenciation...).[414, 436] Ce sont des protéines très conservées (Wnt1-16 : *cf. tableau 6*) ; des mutations ou une dérégulation des Wnt sont associées à diverses malformations et peuvent conduire à la transformation tumorale dans la plupart des organes. Les ligands Wnt4, Wnt5A et Wnt6 sont particulièrement impliqués dans le développement normal de la glande mammaire et peuvent être sécrétés en réponse aux hormones sexuelles au cours des cycles d'invasion/involution. [437-438] D'autres isoformes sont également exprimées à plus faible niveau et sont susceptibles de participer à la tumorigenèse (Wnt1, 2, 7B, 10B...).[439-442]

Gène \ espèce	Poisson zèbre	Xénope	Poulet	Souris	Humain (WNT)
Wnt1	x	x	x	x	x
Wnt2/Wnt13	x	x		x	x
Wnt2B		x	x	x	x
Wnt3	x	x		x	x
Wnt3A		x	x	x	x
Wnt4	x	x	x	x	x
Wnt4B	x	x		x	x
Wnt5A	x	x	x	x	x
Wnt5B		x		x	x
Wnt6		x		x	x
Wnt7A	x	x	x	x	x
Wnt7B		x	x	x	x
Wnt7C		x			
Wnt8A	x	x	x	x	x
Wnt8B	x	x	x	x	x
Wnt9A/Wnt14			x	x	x
Wnt9B/Wnt15				x	x
Wnt10A	x	x		x	x
Wnt10B	x			x	x
Wnt11	x	x	x	x	x
Wnt16				x	x

**Tableau 6 : Conservation des isoformes des ligands Wnt.**

La fixation des ligands Wnt sur le récepteur LRP génère une transmission du signal permettant la phosphorylation de la protéine cytoplasmique **Dishevelled (DSH ou DVL)**, qui peut alors s'associer au corécepteur Frizzled. La formation du complexe DSH/Fz/LRP est à l'origine du recrutement de l'axine à la membrane plasmique, ce qui empêche l'assemblage du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine. De plus, il existe un rétrocontrôle entre les récepteurs membranaires de la voie Wnt et le complexe de destruction par l'intermédiaire des protéine-kinases CK1 et GSK3 $\beta$ . En effet, la phosphorylation du domaine cytoplasmique du récepteur LRP-5/6 par ces enzymes stimule le recrutement de l'axine à la membrane plasmique et favorise l'accumulation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine par échappement au protéasome.[443-444] Ainsi, les ligands de la voie Wnt permettent de protéger la  $\beta$ -caténine de la dégradation pour lui permettre de gagner le noyau et activer la transcription des gènes cibles du complexe TCF/LEF.[445] Le pool nucléaire de  $\beta$ -caténine est également capable de moduler l'activité transcriptionnelle d'autres facteurs comme les protéines Smad3 ou SNAIL1 (et réciproquement).[446-447] (*cf. parties C2 et D*) Enfin, certaines cellules peuvent

secréter des antagonistes pour les récepteurs Frizzled et LRP, capables d'inhiber les effets des ligands Wnt sur la stabilisation de la  $\beta$ -caténine : sFRPs (*soluble Frizzled-Related Proteins*) et DKK1 (*secreted Dickkopf Protein* : corécepteur de LRP). Les protéines WIF (Wnt Inhibitory Factors) lient directement les ligands Wnt pour les séquestrer et empêcher leur fixation sur les récepteurs LRP.[414] (*cf. figure 31*)

### 1.3. Régulation de la transcription par le complexe TCF/LEF/ $\beta$ -caténine

Une fois dans le noyau, la  $\beta$ -caténine convertit le complexe répresseur en un complexe d'activation transcriptionnel en le dissociant de Groucho.[448] Ce complexe nucléaire agit directement sur la régulation de gènes en se liant à des sites consensus (5'-A/T-A/T-C-A-A-A-G-3') présents dans des éléments de réponse spécifiques au niveau des promoteurs.[412, 448] Parmi les gènes régulés par la voie de la  $\beta$ -caténine, on distingue plusieurs gènes largement impliqués dans l'EMT et dans diverses étapes de la progression métastatique. On trouve principalement des **métalloprotéinases matricielles** (MMP-7, MT1-MMP, MMP-26, ADAM10...) et des **composants de la MEC**, tels que la fibronectine et la laminine.[315, 320, 412, 449] Le complexe TCF/LEF actif régule également l'expression de la **vimentine**, la **Claudine 1**, de **récepteurs de surface** (CD44, uPaR), de **cytokines** (IL-8 : Interleukine 8 ; MCP-1 : *Monocyte Chemotactic Protein-1*, VEGF : *Vascular-Endothelial Growth Factor*) et d'autres facteurs spécifiques impliqués dans la prolifération, la migration ou la différenciation (**c-MYC**, **cycline D1**, **SLUG**...). [412, 450-451]

### 1.4. Rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la tumorigenèse

Durant les phénomènes physiologiques ou pathologiques impliquant une EMT de type 1, 2 ou 3, la réorganisation des jonctions adhérentes et la relocalisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine sont considérées comme des marqueurs précoces intervenant dès les premières phases de la dispersion cellulaire.

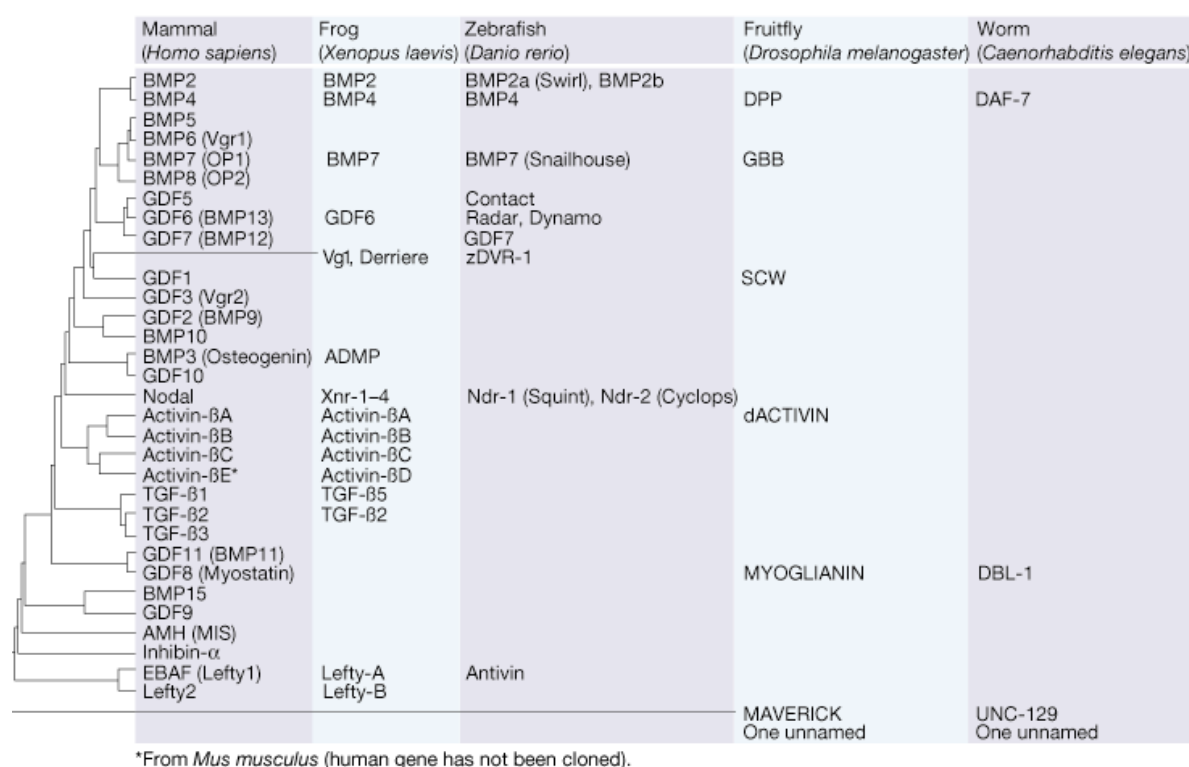
L'implication de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine fait actuellement l'objet de nombreuses études pour son rôle dans le maintien des cellules souches et la dispersion métastatique (MaSCs et CSCs).[452-454] Dans les tumeurs mammaires, une activation de la voie Wnt et/ou un enrichissement du pool nucléaire de  $\beta$ -caténine sont généralement associés à de mauvais pronostics et à l'induction de l'EMT.[259, 414, 453, 455-457] Plusieurs analyses immunohistochimiques menées sur des biopsies de carcinomes canaux et lobulaires infiltrants ont démontré que ces événements sont corrélés à la présence de métastases et à une mortalité plus élevée des patients.[287, 458-461] La transcription des gènes cibles de cette voie de signalisation a également été documentée dans de nombreux systèmes tumoraux *in vitro* et *in vivo*. [412, 450, 462] De même, l'activation de la voie canonique Wnt est un événement clé dans le développement de la plupart des cancers colorectaux sporadiques et familiaux.[453] Dans la majorité des cas, ce signal hyperactif se présente, soit par des mutations inactivatrices d'APC, soit par des mutations de la  $\beta$ -caténine qui la rendent résistante à la phosphorylation par GSK3 $\beta$  (et donc à la dégradation par le protéasome).[450, 463]

Des mécanismes similaires d'activation de la voie  $\beta$ -caténine ont été identifiés dans le développement des carcinomes invasifs de la glande mammaire.[442, 453, 464] Pour finir, dans plusieurs types de cancers du sein, une amplification génique, une activation transcriptionnelle et une expression accrue de la protéine Dishevelled ont également été observées.[465]

## 2 - La voie TGFβ

### 2.1. La superfamille des ligands TGFβ

La superfamille TGFβ (pour Transforming Growth Factor β) comporte à ce jour trente-sept membres identifiés (*cf. figure 32*) ; ce sont de petits polypeptides structurellement proches, avec un domaine caractéristique appelé nœud cystéique. Les ligands de la famille TGFβ comportent quatre domaines : un peptide signal de sécrétion, un pro-domaine, une séquence de clivage par les convertases et le domaine mature. Ces molécules sont sécrétées sous la forme de pro-peptides glycosylés qui doivent être clivés pour être activés. Les pro-protéines convertases (PC, furine convertases) libèrent une forme mature homodimérique qui peut rester associée au pro-domaine de manière non-covalente. L'association des ligands TGFβ à leur pro-domaine forme un complexe latent qui leur permet de ne pas former d'agrégats hydrophobes lors de leur synthèse et leur sécrétion.[466-467] Ces complexes LAP (*Latent Associated Protein*), peuvent s'associer à la protéine LTBP (*Latent TGFβ Binding Protein*) qui interagit avec les protéines de la MEC. La libération du TGFβ de son complexe latent se fait par clivage des protéines de «transport» par des protéases matricielles (plasmine, MMP2 et MMP9...). Ce processus peut être favorisé par la reconnaissance de ces complexes au niveau de la surface membranaire (récepteur IGFR2 mannose 6-phosphate, thrombospondine 1, intégrines, fibronectine, CD44...). Expérimentalement, ces complexes peuvent être dissociés par hydrolyse acide (pH < 3) ou thermique (3' à 80°C).[468-470]



**Figure 32 : Ligands de la superfamille TGFβ chez les mammifères et les modèles animaux.**  
D'après (Massague, J ; 2000) [469]

Ces cytokines peuvent agir de manière autocrine, paracrine ou endocrine (leur demi-vie sous forme active est d'approximativement trois minutes dans le sang).[471] Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques lors du développement embryonnaire (formation des axes, différenciation) ou chez

l'adulte (progression tumorale, maintien des cellules différenciées, reproduction).[469-470, 472] Pour les trois isoformes du TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1,2,3), le signal est médié par des récepteurs transmembranaires spécifiques, répartis en trois classes (TGF $\beta$ RI/ALK, TGF $\beta$ RII, TGF $\beta$ RIII) dont les deux premières hétérodimérisent et possèdent une activité sérine/thréonine-kinase. L'activation du TGF $\beta$ RI déclenche une cascade de signalisation mobilisant principalement le groupe des **Smad (voie canonique)**, mais aussi des voies communes à plusieurs autres stimuli extracellulaires (**voies non canoniques**).[472-474] Les Smads (*Similar to mothers against decapentaplegic homolog*) sont une famille de facteurs de transcription regroupant 8 membres classés en 3 groupes : les «**Receptor activated Smads**» agissant comme facteurs de transcription (R-Smads : Smad1,2,3,5,8) ; les «**common-mediator Smads**» jouant le rôle de molécules navettes (Co-Smads : Smad4) ; et les «**Inhibitory Smads**» capables d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'action des R-Smads (I-Smads : Smad6,7).[253, 469, 472]

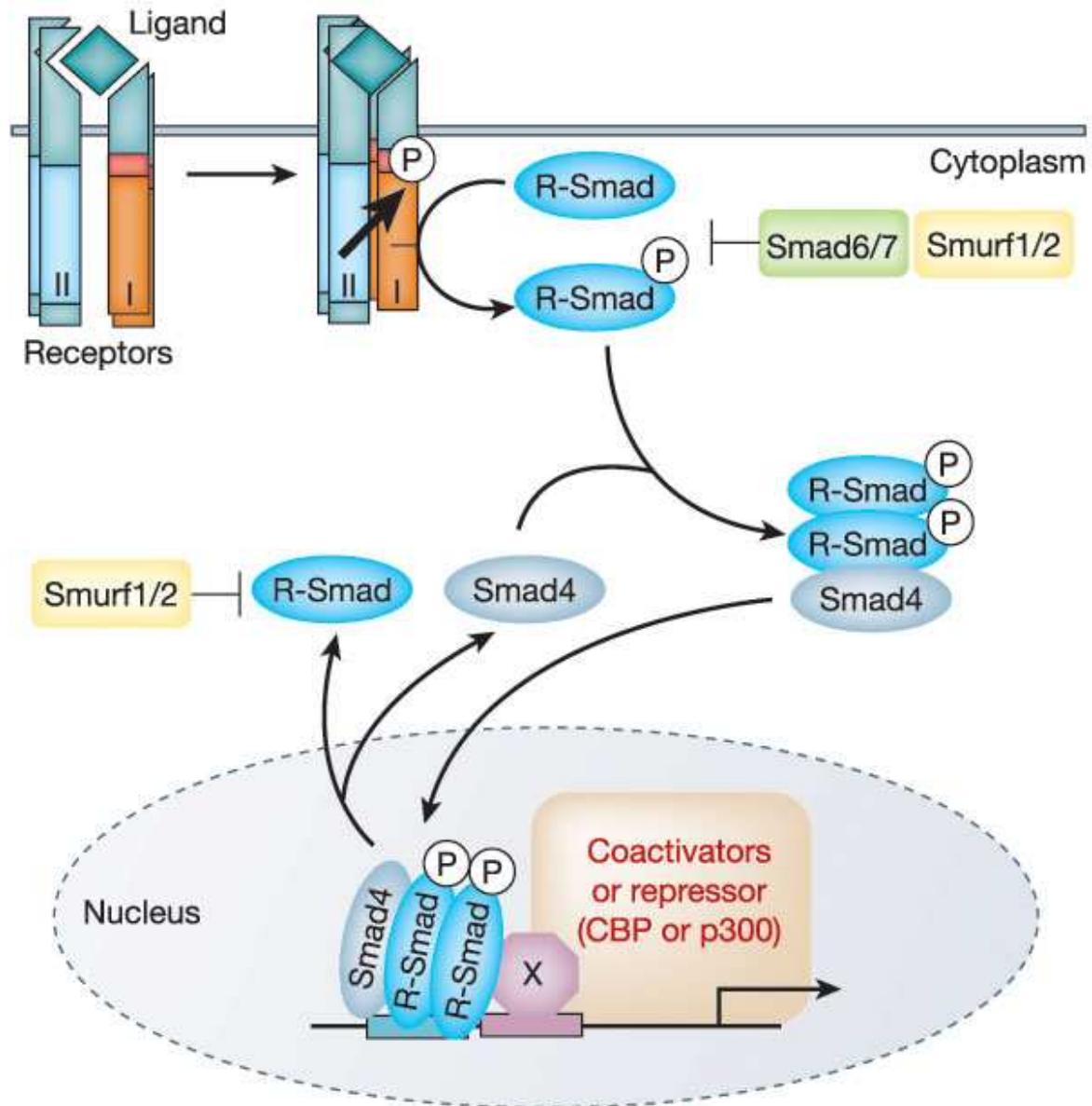
## 2.2. Le TGF $\beta$ au «sommet de la pyramide de l'EMT»

Le TGF $\beta$ 1 est capable d'induire à lui seul l'ensemble des changements morphologiques décrits dans les différents contextes d'EMT, en particulier dans les cellules épithéliales mammaires (perte des jonctions intercellulaires, réorganisation du cytosquelette, perte de la polarité épithéliale et remodelage des adhésions cellule-matrice, sécrétion de protéases...).[253, 475-476] Sa liaison au récepteur hétérodimérique TGF $\beta$ RI/TGF $\beta$ RII induit la phosphorylation du domaine cytoplasmique du récepteur de type I. Il s'ensuit une activation de son domaine catalytique et donc la phosphorylation des facteurs Smad2 et Smad3. Les protéines Phospho-Smad2 et Phospho-Smad3 s'assemblent avec Smad4, une «protéine navette» qui induit la migration du complexe dans le noyau où il active la transcription de nombreux gènes impliqués ou non dans l'EMT.[253, 469-470, 472] (*cf. figure 33*) Ces effets précoces peuvent être prolongés par une amplification du signal grâce à l'activation transcriptionnelle et post-traductionnelle de facteurs de transcription sous l'effet des différents médiateurs cytoplasmiques agissant en aval du complexe TGF $\beta$ RI/RII (*cf. figure 35 + partie D*). De même, l'activation de la voie TGF $\beta$  est associée à la synthèse de petits ARNs régulateurs, les **miRNAs** (microARNs), capables de réguler positivement ou négativement la stabilité et la traduction des ARNs messagers néo-transcrits. Ainsi, la répression de miRNAs des familles miR-200, miR-205 et miR-41 est associée à une perte du phénotype épithélial alors que l'activation de la transcription de miR-10b, miR-21 et miR-155 est corrélée à une augmentation de l'invasion et de la dispersion métastatique.[253]

A l'inverse, il existe une régulation négative de la voie Smad2/3 qui permet de limiter les effets associés à l'activation des récepteurs. La dégradation de ce complexe transcriptionnel est médiée par les E3 ubiquitine-ligases **SMURF1 et 2** qui assurent leur transport vers le protéasome. La surexpression de Smad6 ou Smad7 (Inhibitory Smads) permet le recrutement de ces enzymes et exerce une action inhibitrice sur Smad2/3 responsable d'un maintien de la morphologie épithéliale.[469, 475, 477]

Dans le rein, la signalisation du TGF- $\beta$  et son action sur l'EMT peuvent être contrées par l'action du ligand **BMP7** (*Bone Morphogenic Protein 7*) qui se lie aux récepteurs ALK3/6 pour activer les facteurs Smad1 et Smad5, également capables de se lier à Smad4. Cette liaison exerce une compétition avec le transport nucléaire du complexe Smad2/3 et permet au contraire une relocalisation du complexe Smad1/5 qui induit

l'expression transcriptionnelle de la E-cadhérine et la restauration d'un phénotype épithélial par transition mésenchymo-épithéliale.[478-480] Il est probable que des BMPs circulantes ou sécrétées localement puissent induire la MET via l'activation du complexe Smad1/5 dans la glande mammaire.



**Figure 33 : Modèle d'activation de la voie canonique des Smads par les ligands TGFβ.**

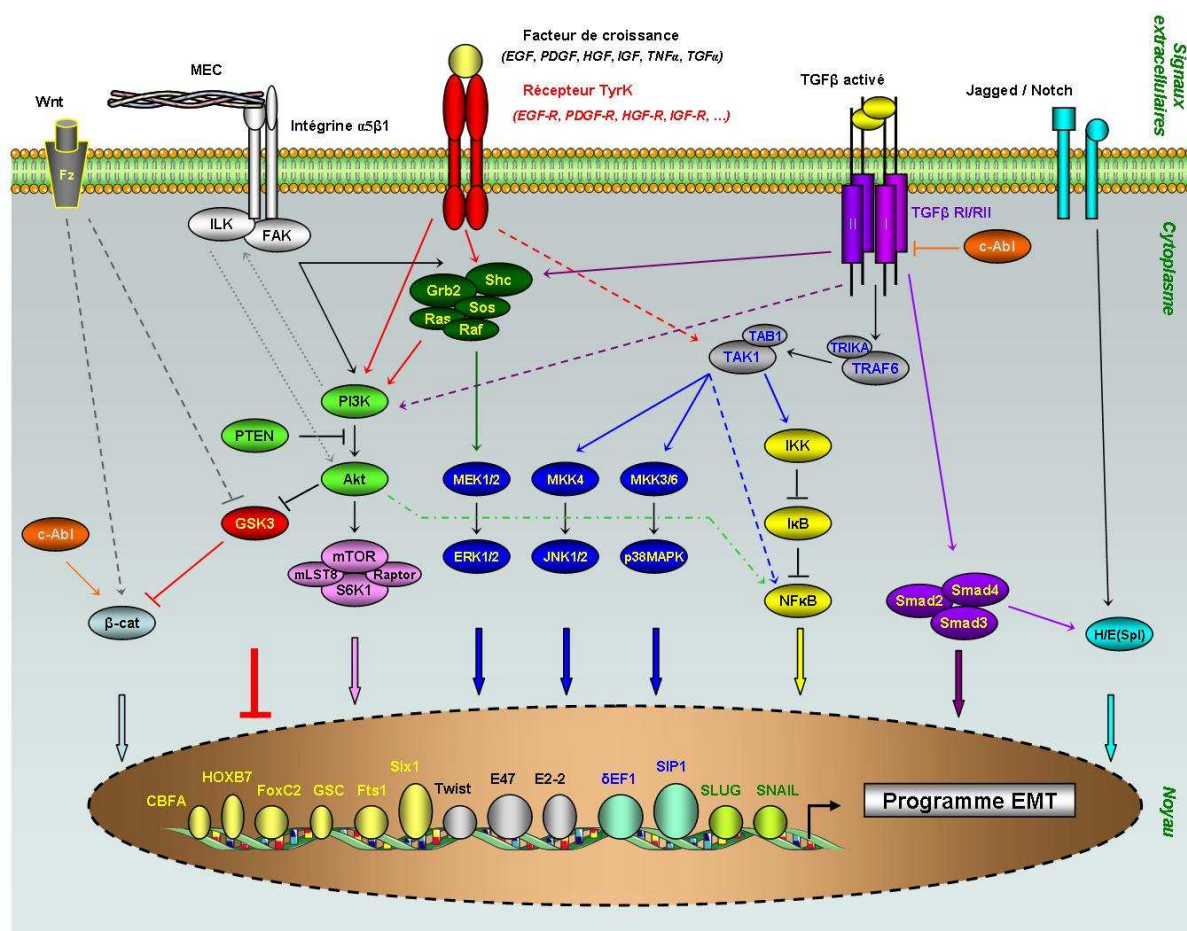
D'après (Derynck, R. & Zhang, YE : 2003) [477]

Le principe d'activation de la voie canonique est le même pour tous les ligands de la famille TGFβ : un homodimère activé se fixe sur un complexe de récepteurs transmembranaires composé de deux hétérodimères TGFβRI/TGFβRII. Le domaine cytoplasmique à activité sérine/thréonine-kinase du TGFβRII est alors activé et il s'ensuit la phosphorylation du domaine GS du TGFβRI (segment rouge). La fonction sérine/thréonine-kinase de ce récepteur permet ensuite la phosphorylation des R-Smads associés (Receptor-activated- Smads : Smad 1, 2, 3, 5, 8) et donc leur liaison à Smad4 (co-Smad) qui sert de molécule navette vers le noyau. Ce complexe fonctionnel ainsi transloqué se fixe à l'ADN au niveau des sites SBE (*Smad Binding Elements* : 5'-CAGACA-3') pour réguler la transcription de nombreux gènes (y compris des facteurs de transcription). Dans le noyau, les R-Smads peuvent former des complexes secondaires avec d'autres facteurs de transcription (X) ; leur activité est également modulée par des co-activateurs ou des co-répresseurs (CBP et p300). Dans le cytoplasme, l'activité et la stabilité des R-Smads est contrôlée par les I-Smads (Inhibitory Smads : Smad6, 7) capables de recruter des ubiquitine-ligases (SMURFS) pour les orienter vers le protéasome.



### 3 - Voies non canoniques et interactions du TGFβ avec les autres facteurs de croissance

En dehors des voies Wnt et TGFβ, de nombreux stimuli provenant du microenvironnement peuvent activer ou inhiber la perte de cohésion cellulaire et/ou la migration. Ceux-ci incluent différents **facteurs de croissance** tels que le FGF, l'EGF, l'IGF, le PDGF ou encore l'HGF, qui se lient tous à des **récepteurs** possédant une **activité tyrosine-kinase** (FGF-R, EGF-R, IGF-R...) agissant sur des cascades de signalisation croisées dont le but est de moduler le niveau d'expression et l'activité de facteurs de transcription exécutant les programmes d'EMT (*cf. partie D*). Comme pour les facteurs Smads, la transduction cytoplasmique du signal par les protéines adaptatrices associées à ces voies, passe par de nombreuses modifications post-traductionnelles dans lesquelles les protéine-kinases jouent un rôle central.



**Figure 34 : Signalisation cellulaire de l'EMT.**

D'après (Berx, G. *et al.* ; 2007) [238] & (Xu, J. *et al.* ; 2009) [475]

Cette figure représente un schéma «simplifié» des voies de signalisation de l'EMT (de nombreuses protéines adaptatrices n'apparaissent pas et ce schéma ne tient pas compte des régulations par les microARNs ou par les protéines associées au cytosquelette ; les interactions croisées avec les petites GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 ne sont pas représentées). La signalisation cellulaire se propage essentiellement à partir de médiateurs solubles ou de protéines de la MEC capables d'activer des récepteurs portant une activité catalytique sur leur domaine cytoplasmique. Il s'ensuit une amplification du signal sous la forme de cascades de signalisation croisées (kinases, phosphatases, adaptateurs moléculaires...) qui convergent toutes vers l'activation, la stabilisation et la translocation nucléaire de facteurs de transcription précoces qui vont alors se lier à l'ADN (β-caténine, Smads, NF-κB, H/E(Spl)...). Ces facteurs précoces activent la synthèse de nombreux gènes, dont des facteurs de transcription «tardifs», qui sont d'abord traduits dans le cytosol avant de retourner dans le noyau pour participer à la régulation génique (SIP1, SNAIL, SLUG...). Ce système exponentiel permet ainsi de réguler l'expression de plusieurs centaines de gènes sous l'effet de la fixation d'un unique ligand.



A ce jour, les enzymes de cette famille pour lesquelles les fonctions sont les mieux décrites sont sans conteste les kinases **PI3K**, **Akt/PKB**, **GSK3 $\beta$** , **IKK** (*I- $\kappa$ B Kinase*) ainsi que les membres de la famille des **MAPKinases**. Leur activité est modulée par de nombreux adaptateurs en relation avec les récepteurs aux facteurs de croissance mais aussi avec les récepteurs de type Jagged et Notch. Des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène fibrillaire I ou la fibronectine peuvent également agir sur la signalisation des intégrines et moduler l'activité des kinases **FAK** (*Focal Adhesion Kinase*) et **ILK** (*Integrin Link Kinase*).[238, 355] (cf. figure 35)

La liaison du TGF $\beta$  sur son récepteur régule plusieurs de ces voies de signalisation de manière Smad-indépendante, pour agir de façon synergique sur la transcription ou induire de nombreux changements dans l'organisation du cytosquelette : activation ou inhibition locale des petites protéines GTPases Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42). La protéine-kinase TAK1 (*TGF $\beta$ -Activated Kinase*) joue un rôle déterminant dans l'activation des voies non canoniques associées aux récepteurs du TGF $\beta$  et permet de recruter la voie des MAPKinases (JNK1/2 et p38MAPK) ainsi que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Le complexe TGF $\beta$ RI/TGF $\beta$ RII est de plus associé aux kinases PI3K et ERK, renforçant la communication entre les différents systèmes de régulation. Il est important de noter que si l'activation de ces différentes molécules n'implique pas l'assemblage du complexe R-Smad/Co-Smad, il semble toutefois que l'expression de Smad2 et Smad3 soit nécessaire à la conversion phénotypique induite par le TGF $\beta$ . [222, 253, 481-482]

### 3.1. La voie des MAPKinases

Les voies de signalisation des **MAPKinases** (MAPK : *Mitogen-Activated Kinase*) font partie des mécanismes de signalisation intracellulaires parmi les plus omniprésents dans les cellules eucaryotes (animales et végétales) et leur activation est commune à la plupart des récepteurs aux facteurs de croissance. Ces voies sont activées par de nombreux stimuli (cytokines, mitogènes, facteurs de différenciation, signaux de stress, inflammation) et elles régulent de manière coordonnée des processus aussi variés que l'embryogenèse, la différenciation, la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose...[483-484] Leur activation constitutive par perte des systèmes de contrôles sus-jacents (mutations des récepteurs et/ou des protéines adaptatrices, inflammation prolongée...) est une des caractéristiques majeures et souvent la première étape du processus de transformation cancéreuse. Dans la glande mammaire, un évènement initiateur de la tumorigenèse fréquemment observé est une mutation du domaine cytoplasmique du récepteur à l'EGF (ERBB1 et ERBB2 essentiellement). Une telle mutation peut se produire sur différents résidus ; la conséquence est en général une activation constitutive du site catalytique (sérine/thréonine-kinase) aboutissant à un maintien permanent de la signalisation des MAPKinases et de toutes ses autres cibles de phosphorylation.[485]

Chez les mammifères, il existe plus d'une douzaine de gènes codant pour les MAPK qui peuvent être classés en 7 voies de signalisation. Récemment, un modèle de classement des MAPK a été proposé en utilisant trois critères : structure, capacité de phosphorylation et activation par les kinases en amont. Ce modèle permet de ségréger les MAPK en deux groupes distincts : les MAPK conventionnelles (ERK1/2/5,

JNK1/2 et p38MAPK) et les MAPK non-conventionnelles (ERK3/4/7 et NLK). Nous nous intéresserons ici uniquement aux MAPKs conventionnelles.[486-487]

Leur régulation est hiérarchisée sous la forme de cascade de phosphorylations : les kinases immédiatement au-dessus des MAPK sont des membres de la famille **MAPKKs** (ERKKs et MEKs : MAPK Kinases) ; elles sont elles mêmes régulées par des **MAPKKKs** (TAK1, kinase Raf...). Dans le cas des MAPKinases ERK1 et ERK2, les MAPKKKs (majoritairement Raf) sont également sous le contrôle de réactions en chaîne, impliquant des protéines périmembranaires associées au domaine cytoplasmique des récepteurs aux facteurs de croissance : Shc, Grb2, Sos et la GTPase Ras.[483] Dans les cellules non transformées, des MKPs (MAPKinases Phosphatases) assurent leur déphosphorylation au fur et à mesure de la transduction du signal pour limiter leur activation prolongée.[488-489] Au cours de la tumorigenèse, une accumulation de mutations peut être observée pour toutes les protéines précédemment décrites, en particulier au niveau des résidus soumis à ces modifications post-traductionnelles. Ainsi, il n'est pas rare d'observer une activation constitutive des MAPKs et une insensibilité aux phosphatases, même en l'absence d'altérations dans la séquence des récepteurs. Les protéines adaptatrices Grb2, Sos, Ras et Raf font également l'objet de nombreuses mutations pro-oncogéniques tout au long de leur séquence. Chaque MAPK activée va phosphoryler à son tour de nombreux substrats (facteurs de transcription, protéines kinases, phospholipases, protéines associées au cytosquelette...) dont un vaste panel est potentiellement impliqué dans la régulation des programmes de l'EMT : NF- $\kappa$ B, cMyc, ETS-1, paxilline, FOXO3, TCF/SRF, ATF1/2... De plus, l'activation de ERK1/2 est connectée à la signalisation des Rho GTPases par l'intermédiaire de la protéine Ras (également une GTPase), capable d'activer à la fois RhoA, Rac1 et Cdc42. Pour finir, la signalisation des MAPKinases est intimement liée à la voie PI3Kinase et leur co-activation par des facteurs de croissance divers (HGF, FGF, IGF, ...) est associée à l'expression d'un phénotype EMT dans de nombreux modèles cellulaires et *in vivo*. [138, 238, 355, 490-491] (*cf. figure 35*)

### 3.2. La voie PI3 Kinase

La signalisation **PI3K**, comme la voie des MAPKinases, est sous la dépendance à la fois des récepteurs à activité tyrosine-kinase, des intégrines et du complexe TGF $\beta$ R1/RII. Ses effets sont ubiquitaires et pléiotropiques ; ils permettent de contrôler la prolifération, l'apoptose, la différenciation ou plus spécifiquement le métabolisme de l'insuline et la régulation de la glycolyse. La protéine PI3K est une **phospho-inositide-kinase** capable de catalyser l'ajout de phosphates en position 3' sur le PIP (Phospho-Inositide 4-Phosphate) ou le **PIP<sub>2</sub>** (PI 4, 5 bisphosphate). Une telle réaction enzymatique aboutit à des dérivés plus réactifs susceptibles d'agir comme messagers secondaires pour diverses protéines cytosoliques.

Ainsi, le PI 3,4,5-trisphosphate (**PIP<sub>3</sub>**) s'associe au domaine PH (Plekstrin Homology) de la **kinase Akt/PKB** pour induire son activité en coopération avec la kinase PDK1 (Pyruvate Dehydrogénase Kinase-1). Dans la plupart des cellules, Akt exerce des effets anti-apoptotiques en inhibant la protéine Bad (Bcl-2 associatid death promoter) et en prévenant l'activation de la voie de mort induite par le cytochrome C (voie intrinsèque mitochondriale).[492] Un autre substrat majeur inhibé par Akt est la sérine/thréonine-kinase GSK3 $\beta$ , un régulateur négatif des programmes de l'EMT. De même que pour les protéine-kinases, la

phosphorylation des inositides par la PI3K est réversible par des phosphatases spécifiques.[144, 492] La **phosphatase PTEN** (Phosphatase and TENsin homologue) permet ainsi le retour du PIP<sub>3</sub> à son état inactif (PIP<sub>2</sub>) et donc l'inactivation d'Akt. Dans la plupart des cellules non apoptotiques, la voie PI3K/Akt est activée et l'activité de PTEN et GSK3β est inhibée par défaut. Au cours de l'EMT, la perte des contacts avec la lame basale peut être à l'origine de l'activation d'un certain nombre de signaux de mort cellulaire contre lesquels les cellules doivent se protéger par une stimulation prolongée de la PI3K. On trouve ainsi de nombreuses études faisant mention de la régulation des différents composants de cette voie au cours des EMTs physiologiques et pathologiques.[144, 493-496] (*cf. figure 35*)

### 3.3. La voie NF-κB

Le facteur **NF-κB/REL** (*Nuclear Factor-kappaB / Relish drosophila homologue*) correspond à une famille de cinq protéines hétérogènes, toutes exprimées de façon ubiquitaire : p65/REL-A, REL-B, c-REL, p50/NF-κB1 et p52/NF-κB2. A l'état natif, ce sont des protéines cytosoliques inactives, associées à un inhibiteur constitutif : les **facteurs I-κB** (*Inhibitor of NF-κB* : I-κBa, I-κBβ, I-κBγ...) Lorsque les protéines NF-κB sont activées, elles subissent une translocation nucléaire pour agir comme facteurs de transcription et induire l'expression de nombreux gènes dont une grande partie est impliquée dans la réponse inflammatoire ou la survie cellulaire (Interleukines, Immunoglobulines, TNFα...).

L'activation de NF-κB dans les cellules peut se faire sous le contrôle de différents signaux : cytokines (TNFα, EGF...), interaction avec des pathogènes (LPS : Lipopolysaccharides bactériens, protéines virales...), stress oxydatif, stress métabolique (hypoxie, acidité...), carcinogènes multiples (benzène...). L'ensemble de ces signaux aboutit à des cascades de signalisation dont le but est de réguler la stabilité de la protéine inhibitrice I-κB et permettre la libération du facteur NF-κB. Le principe de dégradation de la protéine I-κB est très similaire à celui de la β-caténine et passe par une succession de modifications post-traductionnelles impliquant essentiellement la **protéine-kinase IKK** et la E3 ubiquitine-ligase **β-TrCP**. Ces deux enzymes agissent sous la forme de complexes macromoléculaires : la kinase IKK est formée de trois sous-unités (deux sous-unités catalytiques IKKα et β ainsi qu'une sous-unité régulatrice IKKγ, alias NEMO) et β-TrCP forme le complexe **SCF** (*Skp1-CUL1-F-box ligase Containing the F-box β-TrCP*) avec les ubiquitine-ligases de type RING, ROC1, RBX1 et Ubc45.[497-498] La séquence consensus DSGGLDS est reconnue par IKK qui phosphoryle les sérines S<sup>32</sup> et S<sup>36</sup>, générant ainsi un **motif DS<sup>P</sup>GxxS<sup>P</sup>** reconnu par β-TrCP. Comme pour la β-caténine, la poly-ubiquitination d'I-κB aboutit à sa dégradation par le protéasome. L'inhibition constitutive de NF-κB est alors levée et ce facteur est transloqué dans le noyau pour interagir directement avec l'ADN ou se fixer sur d'autres facteurs de transcription et moduler leur activité.[499-501]

Dans la plupart des types tumoraux, NF-κB est constitutivement activé et joue essentiellement un rôle pro-oncogénique et pro-inflammatoire. De plus, les protéines NF-κB sont susceptibles de favoriser la survenue de métastases en régulant l'expression de protéases (MMP9, uPA), de la vimentine, de facteurs angiogéniques (VEGF, IL8) et de molécules d'adhésion associées à l'invasion (CXCR4, ICAM-1, VCAM-1).[502] Dans les cellules en culture, l'induction de l'EMT par diverses cytokines (TGFβ, EGF, FGF, HGF...) est fréquemment

associée à la translocation nucléaire de NF-κB.[503-505] La régulation du facteur NF-κB est également sous la dépendance des protéine-kinases Akt/PKB et TAK1 (*cf. figure 35*) et son activation constitutive est associée à la perte du contrôle des œstrogènes sur le récepteur ERα dans les carcinomes ducto-lobulaires invasifs.[495, 506-507] Pour finir, il existe de nombreuses autres protéine-kinases susceptibles de réguler la signalisation NF-κB par des phosphorylations activatrices ou inhibitrices affectant les différents niveaux de contrôle de la voie (CK2, AMPK...).[508]

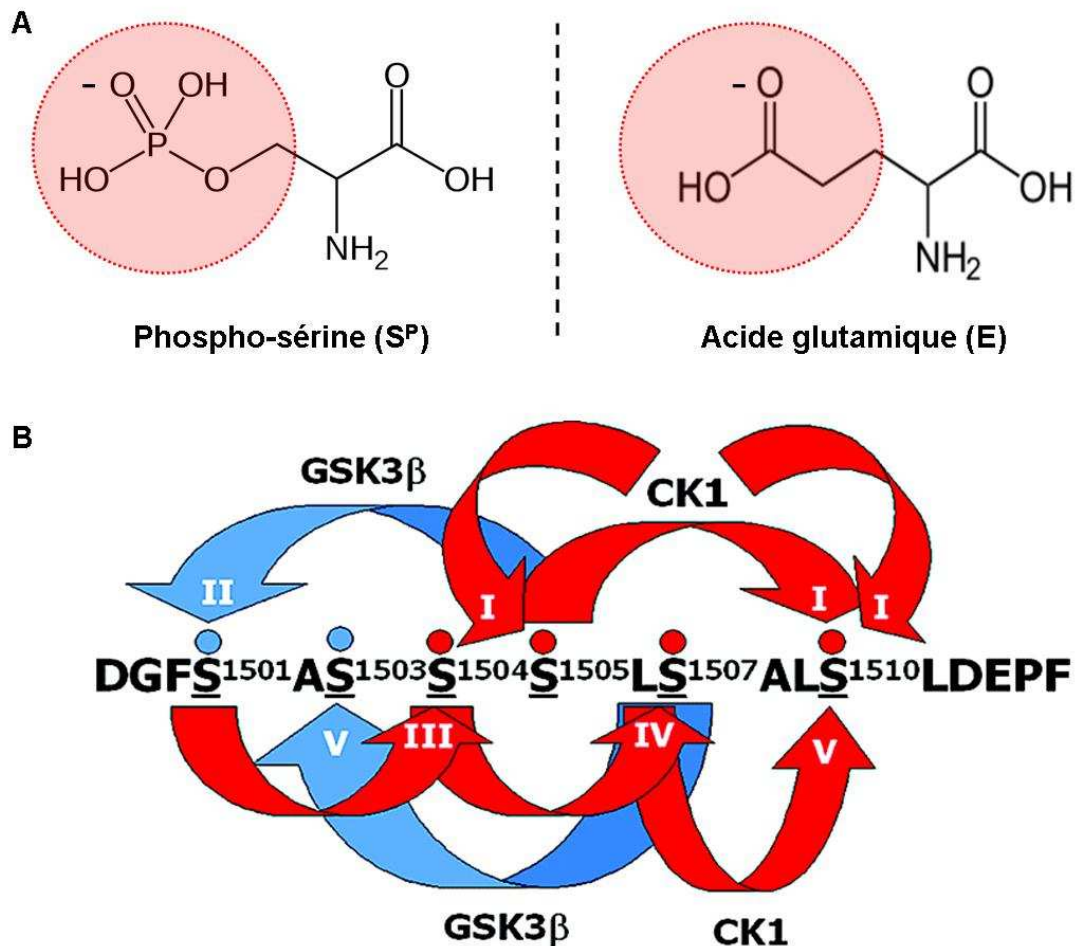
### 3.4. La protéine-kinase GSK3β comme «rempart» de l'EMT

GSK3β une sérine/thréonine-kinase fortement conservée chez l'ensemble des protozoaires de par ses fonctions dans la régulation du métabolisme du glycogène. Cette enzyme est considérée comme un des régulateurs négatifs majeurs de la signalisation de l'EMT, en particulier au cours de la tumorigenèse.[509] GSK3β est en effet un point de convergence pour plusieurs voies de signalisation et cette kinase exerce une régulation négative sur certains facteurs de transcription majeurs de l'EMT. Dans les cellules épithéliales en culture, son inhibition (par des inhibiteurs chimiques ou par ARN interférence) est un évènement suffisant pour induire l'activation des programmes de l'EMT et l'acquisition d'un phénotype migratoire.[510-511] Elle est impliquée à plusieurs niveaux dans les évènements de **multi-phosphorylation** associés à l'activation des sites contrôlant la dégradation et/ou de la localisation subcellulaire de diverses protéines cytoplasmiques (Microtubule Associated Proteins, APC, Axine, cycline D1, kinases, phosphatases...) et de facteurs de transcription nucléaires (NF-κB, β-caténine, CREB, c-Myc, SNAIL1...).[512-513]

Le site consensus reconnu par GSK3β est un motif consensus acide de type **S/TxxxE** (les résidus x sont préférentiellement des prolines et l'acide glutamique E peut être remplacé par un acide aspartique D, une phospho-sérine S<sup>P</sup>, une phospho-thréonine T<sup>P</sup> ou encore une proline P). *In vitro* et dans les cellules en culture, la reconnaissance directe de ce motif est souvent très limitée en l'absence de pré-phosphorylation (**priming**) par d'autres kinases (principalement CK1 et CK2). Ainsi, l'ajout d'un phosphate sur une sérine ou une thréonine en position +4 du site consensus de GSK3β apporte des charges négatives qui induisent des changements conformationnels servant d'amorce à la reconnaissance secondaire par GSK3β (le résidu phosphorylé est préférentiellement en position +4 mais peut également se situer au niveau des positions -4, -3, +2, +3, +5 et +6 par rapport au dernier résidu acide du site consensus). Il est à noter que cette pré-phosphorylation n'est pas strictement requise mais augmente l'efficacité de liaison de GSK3β à son substrat de l'ordre de 100 à 1000 fois.[416-417, 514] (*cf. figure 35*) Des mutations dans ces sites consensus sont généralement associées à une stabilisation aberrante et/ou une activation constitutive de protéines pouvant jouer un rôle pro-oncogénique (β-caténine, c-MYC, APC...).[515-517]

L'activité de GSK3β est principalement régulée par la phosphorylation de son domaine N-terminal (sérine 9) qui induit un changement de conformation inhibiteur de son domaine catalytique. Cette modification post-traductionnelle est essentiellement assurée par la protéine-kinase **Akt/PKB**, directement ou indirectement recrutée par les voies Wnt, TGFβ, PI3K et MAPK. (*cf. figure 35*) D'autres protéine-kinases peuvent catalyser cette phosphorylation inhibitrice : **PKC** (activé par les ligands Wnt, les intégrines et les Rho

GTPases), **PKA** (activée par la forskoline) et **p90Rsk** (activée par les MAPK). Étonnamment, bien que ces voies convergent vers le même système d'inhibition, les substrats de GSK3 $\beta$  sont spécifiquement affectés, de même que la régulation biologique correspondante. Ainsi, il est probable que de nombreux co-activateurs/inhibiteurs participent à la reconnaissance de ces substrats ainsi qu'à l'intégration des signaux provenant de l'espace extracellulaire, de la MEC ou encore du cytosquelette.[417, 518-519]



**Figure 35 : Multi-phosphorylation séquentielle de la protéine APC par les kinases CK1 et GSK3 $\beta$ .**  
D'après (Ferrarese, A. *et al.* 2007) [416]

**(A)** La structure des chaînes latérales des résidus phospho-sérine (S<sup>P</sup>) et acide glutamique (E) présente de nombreuses similitudes : dans les deux cas, la présence de groupements C=O et C-OH fortement polarisés génère un contexte acide qui peut être reconnu par les protéine-kinases spécifiques de tels environnements stériques (kinases GSK3 $\beta$ , CK1 et CK2 essentiellement).

**(B)** Le site consensus normalement phosphorylé par GSK3 $\beta$  dans la protéine APC est localisé au niveau d'un domaine riche en sérines (SRD : *Serine Rich Domain*) en position centrale (résidus 1501 à 1507). Le motif consensus reconnu est de type **SASSSL**S et ne contient pas de résidu acide (acide aspartique D ou acide glutamique E). Dans ce cas une pré-phosphorylation par une autre protéine-kinase s'avère nécessaire pour une reconnaissance optimale par GSK3 $\beta$ . La kinase CK1 ne nécessite pas de « priming » et peut reconnaître directement la sérine S<sup>1505</sup> en position +6 par rapport au début du site consensus. Cette phosphorylation du résidu S<sup>1505</sup> permet de générer un site **SASSSL**S<sup>P</sup> plus acide qui est reconnu par GSK3 $\beta$  sur la sérine S<sup>1501</sup>. Il s'ensuit une amplification du contexte acide et du nombre de charges négatives qui aboutissent à des changements de conformation permettant de déplier le domaine SRD. Cette structure favorise les deux kinases alors capables de catalyser l'ajout de phosphates sur l'ensemble des résidus selon une chronologie spécifique (sérines 1505 et 1510 puis 1501, 1504, 1507, 1503 et 1510).

### 3.5. Autres voies de signalisation

De nombreuses études dans des modèles cellulaires et *in vivo* ont permis d'identifier plusieurs voies de signalisation interconnectées avec le TGF $\beta$  par l'intermédiaire des protéines Smad ou sous l'effet d'interactions directe avec les récepteurs TGF $\beta$ RI/RII (voies non canoniques). A ce jour, les principaux effecteurs de l'EMT décrits comme associés au TGF $\beta$  sont les voies Notch et mTOR ainsi que les petites GTPases Rho. Dans les cellules épithéliales mammaires, les récepteurs aux œstrogènes et la protéine-kinase cAbl (activée par le PDGF) peuvent également moduler positivement ou négativement les effets promigatoires du TGF $\beta$ . (cf. figure 35)

- **Voie Jagged/Notch** : les récepteurs Notch (Notch1, 2, 3 ou 4) sont des complexes organisés autour d'une protéine monomérique transmembranaire avec un long **domaine extracellulaire** composé de nombreux segments répétitifs de type EGF. Ce segment est associé à deux autres sous-unités également transmembranaires : le **segment cytoplasmique** (formé d'un long domaine intracellulaire ancré à la membrane plasmique et d'une courte portion N-terminale en contact avec le segment extracellulaire) et la **préséniline-1** (ou  $\gamma$ -secrétase : protéase à plusieurs passages transmembranaires). Notch possède deux types de ligands : Delta et **Jagged**, deux protéines transmembranaires dont la structure est très semblable à celle du segment extracellulaire de Notch, ce qui leur permet de former des interactions homophiliques (entre deux cellules voisines ou sur la membrane plasmique d'une même cellule). Le processus d'activation du récepteur Notch par ses ligands est une cascade de protéolyses initiée par la TM-MMP **TACE** (*Tumor necrosis factor Alpha Converting Enzyme*) qui clive le segment extracellulaire et le libère à la fois du ligand et du récepteur. Ce clivage permet l'activation de la préséniline qui protéolyse alors le segment cytoplasmique (CSL-CBF1) pour permettre sa translocation nucléaire et sa fixation à des facteurs de transcription pour réguler leur activité. Ainsi, la formation du complexe Jagged/Notch aboutit à l'activation du facteur RBP/Jk/CBF1/Su(H) qui induit l'expression des gènes de la famille Hes (H/E-Spl : *Hairy-enhancer of split*).[520-521] Cette série d'activations transcriptionnelles permet de réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans le développement embryonnaire, la différenciation neuronale, la survie cellulaire, la tumorigenèse, et bien sûr l'EMT. L'activation de la voie Notch a récemment été mise en évidence comme potentiellement impliquée dans le maintien de la pluripotence des cellules souches normales (CFUs caractérisées par la formation de mammosphères) et cancéreuses de l'épithélium mammaire (cellules CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>).[522-523] Enfin, plusieurs analyses *in vivo* ont permis de mettre en évidence une coopération entre les complexes Smad et les effecteurs de la signalisation Notch pour amplifier la transcription des gènes nécessaires à l'induction de l'EMT.[355, 524-525]

- **GTPases Rho** : les récepteurs TGF $\beta$ RI et TGF $\beta$ RII sont en contact étroit avec d'autres protéines de surface susceptibles de moduler leur action de façon réciproque. Ce complexe transducteur est associé à PAR6 au niveau des jonctions serrées, et sélectivement séquestré dans le compartiment apical. La phosphorylation de PAR6 par le domaine catalytique du TGF $\beta$ RII est nécessaire à l'induction de l'EMT dans cellules épithéliales mammaires et semble jouer un rôle dans la progression tumorale.[253, 526-527] Cette phosphorylation permet l'activation de l'ubiquitine-ligase **SMURF1** capable de dégrader **RhoA** pour

déstructurer le cytosquelette et provoquer la perte de polarité épithéliale.[42] A l'inverse, l'activation de la voie TGFβ est associée à une activation de RhoA et sa translocation vers les fibres de stress pour provoquer leur contractilité (signalisation ROCK/LIMK-cofiline/MLCK-MyosineII).[475, 528] Ces effets antagonistes illustrent bien la régulation spatio-temporelle complexe qui s'exerce sur l'activité des petites GTPases Rho.

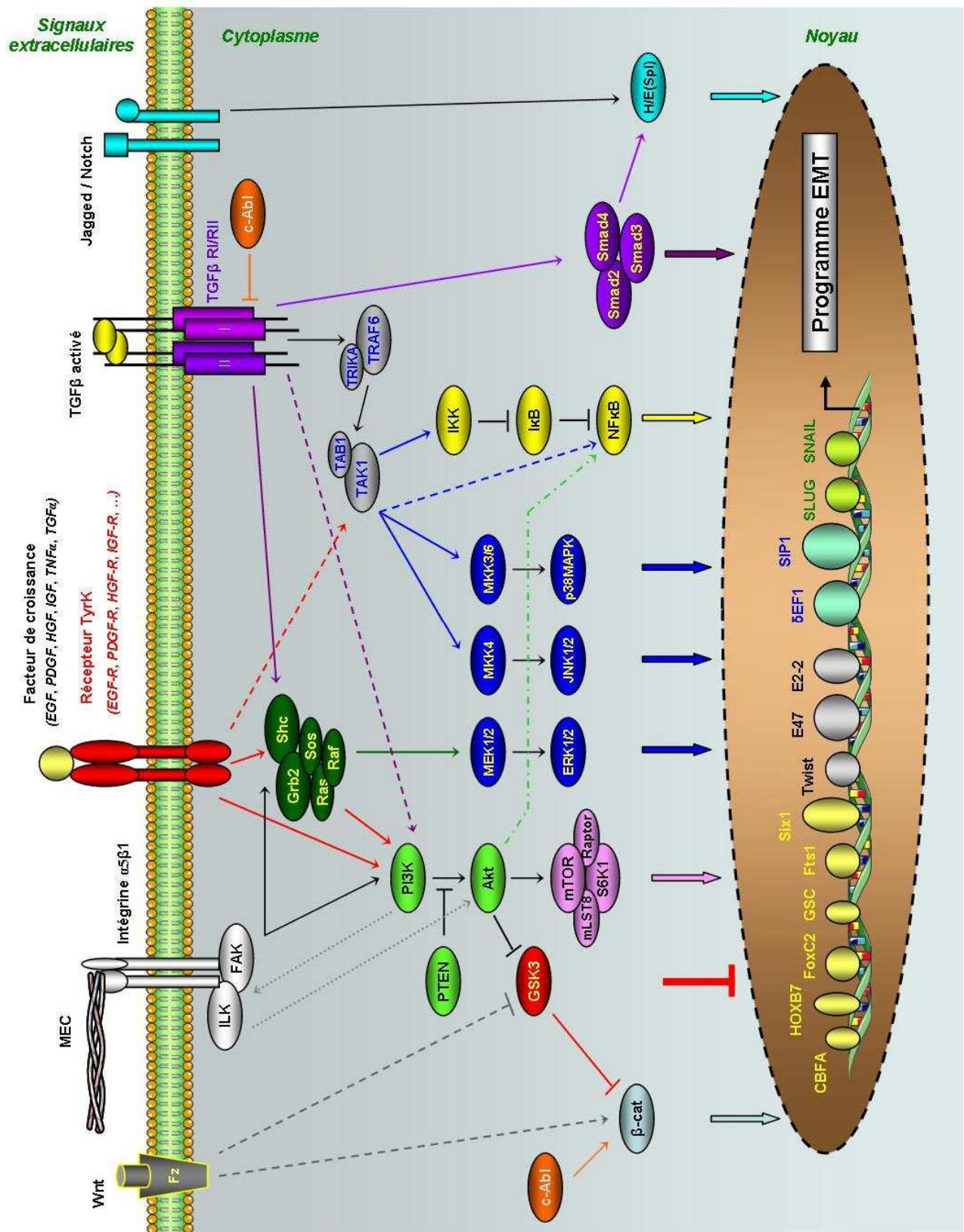
L'activation des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 est également directement sous la dépendance des voies non canoniques du TGFβ par l'intermédiaire de Ras et du complexe Shc/Grb2/Sos.[475]

- **Voie mTOR** : l'activation de la voie PI3K/Akt par le TGF-β induit également l'activation de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) qui interagit avec la protéine Raptor pour permettre la phosphorylation de la S6Kinase-1 et de 4EBP-1 (*4E-Binding Protein-1*). Cette cascade d'évènements aboutit à une augmentation de la taille des cellules et de leur noyau ainsi qu'une activation de la synthèse protéique. Dans les cellules tumorales mammaires, l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine ne modifie pas le phénotype global induit par le TGFβ (diminution d'expression de la E-cadherine, formation de fibres de stress et synthèse de fibronectine) mais réduit significativement leur potentiel migratoire et d'invasion. Ces données soulignent le rôle potentiellement anti-invasif de mTOR dans les cancers du sein.[475, 529]

- **Voie PDGF / c-Abl** : le cas de la kinase c-Abl (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog-1*) illustre bien la complexité de la régulation exercée par les adaptateurs cytoplasmiques sur la mise en place d'un programme de type EMT. En effet, il semble que la plupart des régulateurs décrits dans les paragraphes précédents puissent jouer des rôles à la fois inducteurs et inhibiteurs sur les mêmes effecteurs, en fonction du contexte cellulaire et des signaux provenant du microenvironnement. Ainsi, un rôle dans l'EMT a récemment été décrit pour la protéine-kinase c-Abl dont l'activation abolit les effets pro-invasifs du TGFβ sur les cellules métastatiques des carcinomes mammaires.[530] A l'inverse, dans des cellules tumorales du colon, l'activation de c-Abl par un traitement au **PDGF** (*Platelet-Derived Growth Factor*) est responsable d'une phosphorylation de l'hélicase p68 qui induit sa liaison à la β-caténine. Ce complexe est transloqué dans le noyau pour activer la transcription et induire l'EMT de manière Wnt indépendante. Enfin, le *glivec STI571®*, un inhibiteur pharmacologique de la voie PDGF / c-Abl inhibe la formation de nodules métastatiques secondaires dans les modèles de souris athymiques ayant reçu une injection de cellules cancéreuses mammaires humaines et murines.[238, 531]

- **Récepteurs aux hormones sexuelles** : ce sont des récepteurs nucléaires qui agissent directement comme facteurs de transcription par translocation du cytosol vers le noyau, après fixation de leur substrat hydrophobe. Dans les cellules épithéliales mammaires, il existe une relation antagoniste entre la signalisation des œstrogènes et celle du TGFβ. La perte du récepteur **ER-α** (*Estrogen Receptor α*) dans ces cellules tubulaires ou lobulaires est généralement associée à une transformation cancéreuse et une prolifération anarchique. Dans les cellules en culture, l'invalidation génique de l'ER-α conduit à une activation de la signalisation TGFβ et à l'induction d'un phénotype migratoire.[222, 253, 532] La signalisation du récepteur à la progestérone (**PGR-α**) tend également à s'opposer à l'acquisition d'un phénotype migratoire par les cellules tumorales « basal like ».[533]





**Figure 34bis (agrandissement) : Signalisation de l'EMT dans les cellules épithéliales mammaires transformées.**

D'après (Berx, G. *et al.* ; 2007) [238] & (Xu, J. *et al.* ; 2009) [475]

Schéma «simplifié» des voies de signalisation de l'EMT : de nombreuses protéines adaptatrices n'apparaissent pas et ce schéma ne tient pas compte des régulations par les microARNs ou par les protéines associées au cytosquelette ; les interactions croisées avec les petites GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 ne sont pas représentées.

## **B. Facteurs de transcription de l'EMT**

La plupart des voies de signalisation décrites dans le sous-chapitre précédent convergent vers une série de régulateurs transcriptionnels qui contribuent à la régulation de nombreux gènes cibles. En dehors des «facteurs précoces» directement associés aux complexes de signalisation cytoplasmiques (NF- $\kappa$ B, TCF-1/LEF-1,  $\beta$ -caténine, Smads, H/S-Spl...), il existe plusieurs familles de «facteurs tardifs» réprimant directement l'expression de nombreuses protéines typiquement épithéliales (E-cadhérine, claudines, cytokératines, laminine, collagènes globulaires...) ou, au contraire, d'induire la synthèse de marqueurs fibroblastoïdes et de gènes pro-migratoires (vimentine, fibronectine, collagènes fibrillaires, MMPs...).

### **1 - Activation et gènes cibles**

A ce jour, plus d'une dizaine de ces facteurs de transcription ont été décrits (*cf. tableau 5 + figure 35*) ; nous nous intéresserons ici uniquement aux familles de protéines à domaine bHLH (*Helix-Loop-Helix*) et à domaine en «doigt-de-zinc» (familles SNAIL et ZEB), en considérant leur rôle dans la régulation des biomarqueurs de l'EMT (ces facteurs ciblent également des gènes impliqués dans des fonctions aussi diverses que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et le métabolisme).[534-539]

- **superfamille SNAIL/SNAI** : SNAIL1/SNAIL, SNAIL2/SLUG et SNAIL3/SMUC

- **famille ZEB** : ZEB1 ( $\delta$ EF1) et ZEB2 (SIP1)

- **facteurs bHLH** : TCF3 (E47/E12), TWIST1/2, ID1/2, TCF4 (E2-2A et 2B)

Même s'il existe de nombreuses spécificités de liaison à l'ADN, les régulateurs transcriptionnels de l'EMT (EMT-TFs : EMT-Transcription Factors) ont en commun la reconnaissance d'un motif spécifique de type **E-box** (5'-CANNTG-3' : 5'-CACCTG-3' ou son complément 5'-CAGGTG-3') retrouvé en un ou plusieurs exemplaires dans la séquence promotrice de la plupart des gènes encodés spécifiquement dans les cellules épithéliales différenciées (*cf. chapitre 1 + figure 36*). La fixation des facteurs SNAIL, ZEB et bHLH sur de tels motifs permet le recrutement de divers complexes de remodelage de la chromatine agissant essentiellement par des modifications post-traductionnelles des protéines de structuration de l'ADN (principalement des modifications des histones par les **HDACs**). Ces modifications des histones sont reconnues par d'autres complexes protéiques capables de compacter la chromatine autour des motifs E-box et ainsi d'éteindre le promoteur et donc l'expression du gène adjacent. Le promoteur du gène de la E-cadhérine (*CDH1*) contient six exemplaires du motif E-box (dont cinq motifs 5'-CACCTG-3') reconnus par la grande majorité des facteurs de transcription précédemment cités.[534-537, 540]

Ainsi, au cours de l'EMT de type 1, 2 et 3 ; l'expression, la stabilisation et l'activation de ces protéines est responsable de l'arrêt très rapide de la transcription du gène *CDH1*, suivi en quelques heures de l'effondrement de jonctions adhérentes : le délai entre la répression transcriptionnelle de *CDH1* et la disparition du pool protéique de E-cadhérine peut varier de 12 à 72h selon le facteur de transcription concerné (affinité variable pour le motif E-box), le type cellulaire et l'activation des systèmes de dégradation de la protéine E-cadhérine (ubiquitine-ligases et protéasome). La séquence E-box est également présente

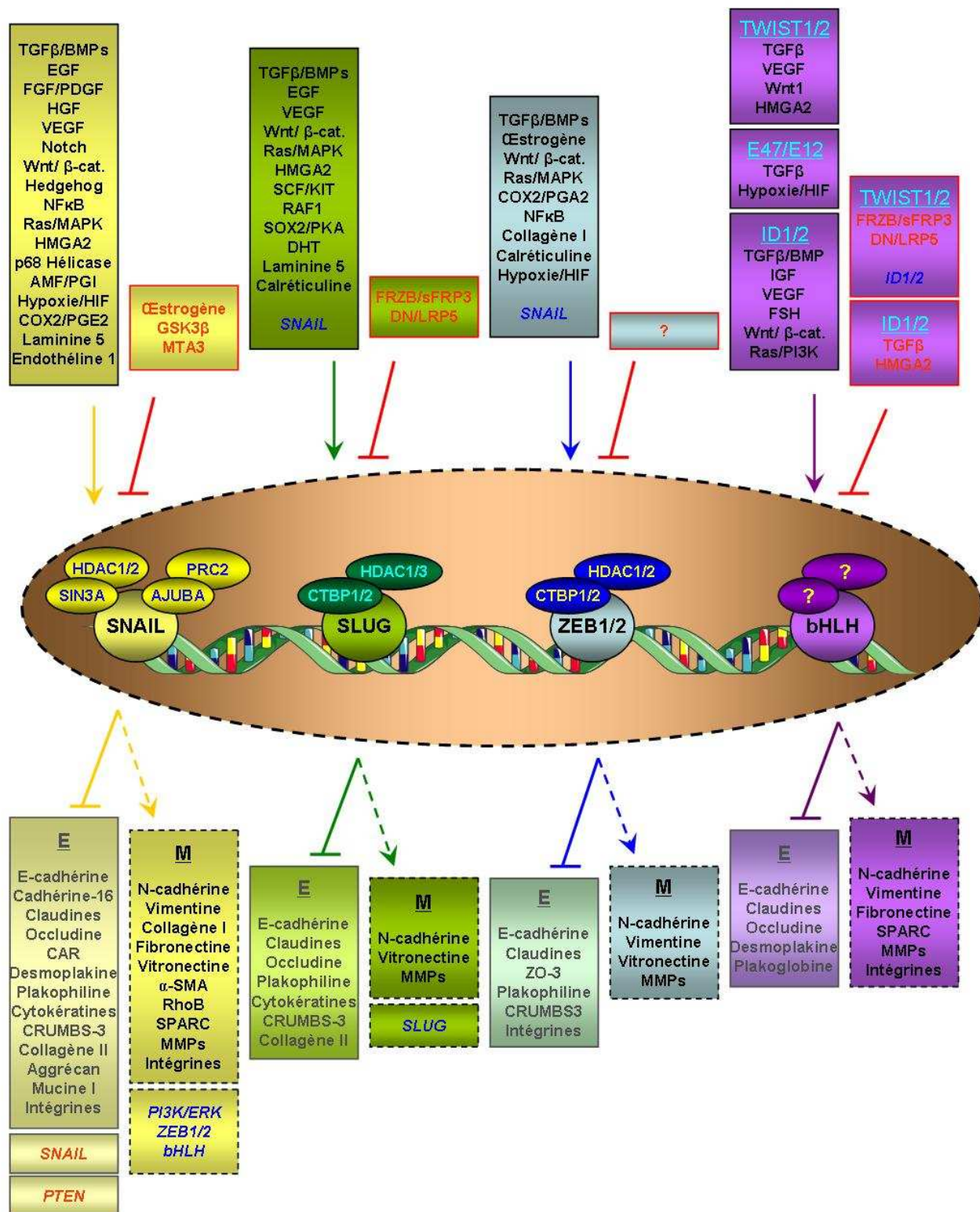
dans le promoteur des gènes encodant les claudines 1 et 4, les protéines ZO et de nombreux autres composants spécifiques ou non des cellules épithéliales (TP53, P21/CDKN1...) [83, 534, 541]

La voie TGF $\beta$  peut agir directement sur la transcription de tous ces facteurs par l'intermédiaire des protéines Smad dans de nombreux contextes cellulaires. De manière plus indirecte, le TGF $\beta$  et de nombreuses autres molécules (facteurs de croissance, protéines de la MEC, senseurs d'hypoxie, Wnt...) peuvent également moduler leur transcription, leur stabilisation ou leur activation dans le but d'amplifier la réponse cellulaire destinée à promouvoir l'acquisition d'un phénotype migratoire.[475] L'activation des Smads est également associée à une expression élevée de **HMGA2** (*High Mobility Group, member A2*), un facteur de transcription spécifique des régions «AT-rich» de l'ADN. HMGA2 est largement induit au cours du développement embryonnaire et normalement éteint dans les cellules adultes ; son expression aberrante peut être observée dans de nombreux tissus cancéreux. Cette protéine est capable d'induire la transcription de SNAIL1 et SLUG ainsi que celle de la protéine bHLH TWIST1.[475, 542] (*cf. figure 36*)

En plus de leur rôle de répresseur des séquences E-box, les **EMT-TFs** sont capables d'activer la transcription de nombreux gènes spécifiques des cellules fibroblastoïdes motiles. Leur fixation sur l'ADN permet le recrutement de complexes spécialisés dans l'activation des régions promotrices par décondensation de l'ADN : les **HATs** (Histone Acetyl-Transférases), recrutées par des co-activateurs transcriptionnels. Les mécanismes d'activation génique par les EMT-TFs sont beaucoup moins bien caractérisés que leurs fonctions inhibitrices mais des études récentes ont permis d'identifier des séquences redondantes dans les promoteurs de plusieurs gènes concernés.[534-537, 540] La **séquence FTS-1** (*Fibroblast Transcription Site-1*) est un motif de type 5'-CCAAT-3', initialement identifié en amont du gène codant pour la protéine S100A4/FSP-1 (Fibroblast Specific Protein) et conservé dans le promoteur de la vimentine,  $\alpha$ -SMA, HMGA2 et plusieurs facteurs de transcription (SNAIL1, TWIST1/2, LEF1, ETS-1).[124, 541, 543]

De façon intéressante, cette séquence est également présente en plusieurs copies dans le promoteur de la E-cadhérine, la  $\beta$ -caténine et de ZO-1, renforçant l'hypothèse selon laquelle les motifs E-box et/ou FTS-1 pourraient participer à des mécanismes de répression et d'activation, en fonction de contextes cellulaires et de co-régulateurs spécifiques. A ce jour, le seul facteur de transcription identifié capable d'interagir avec la séquence FTS-1 est la protéine **CBF-A/NFY-A** (CCAAT-Binding Factor-A/Nuclear transcription Factor Y-A), un membre de la famille des «bZIP-TFs» (*basic region / leucine ZIPper motif Transcription Factors*) dont l'expression est indispensable pour le développement complet de l'épithélium galactophore ducto-lobulaire ; son gène est régulièrement muté dans les cancers du sein.[544-545] CBF-A agit sous forme d'un complexe trimérique (CBF-A/B/C) associé au co-activateur/répresseur **KAP-1/TRIM28** (*TRIp partite Motif protein 28*) et régulé négativement par le suppresseur de tumeur P53.[534, 541] Le rôle précis de CBF dans l'EMT est encore mal compris mais il n'est pas exclu que cette protéine puisse former des complexes secondaires avec différents EMT-TFs pour activer ou réprimer l'expression des gènes contenant le motif FTS-1.[124, 546]

Enfin, il existe également une forte probabilité pour que l'activation transcriptionnelle d'un certain nombre de gènes décrits comme des cibles directes de ces facteurs de transcription soient en fait la conséquence indirecte de leur expression (par exemple par la stimulation d'autres protéines régulatrices telles que les **Smads**, **NF- $\kappa$ B** ou le complexe **TCF/LEF/ $\beta$ -caténine**).[495, 536]



**Figure 36 : Les facteurs de transcription au centre des programmes de l'EMT.**

D'après (Peinado, H. *et al.* ; 2007) ; (Nieto, M.A. ; 2008) & (Herreros, A.G. *et al.* ; 2010) [534-536]

Les facteurs de transcription de l'EMT sont essentiellement de deux types : Zinc Finger (SNAIL, SLUG, ZEB1/2) ou bHLH (TWIST1/2, E47/E12, ID1/2). Ils permettent d'intégrer les signaux en provenance des récepteurs transmembranaires (récepteurs aux facteurs de croissance, récepteurs hormonaux, intégrines) pour réprimer l'expression des gènes épithéliaux (E) et activer l'expression des gènes associés à la migration (M) : jonctions cellulaires, cytosquelette, MEC.... Ces protéines interagissent avec des co-régulateurs (SIN3A, AJUBA, CTBP) qui opèrent par recrutement de complexes de remodelage de la chromatine. Ces complexes peuvent réprimer des gènes par compaction de l'ADN (HDACs : Histone DéACetylases ; PRC2 : Polycomb group Protein 2 / H3K<sub>27</sub>-tri-méthylase) ou au contraire les activer (la décompaction de la chromatine est assurée par les HATs : Histone Acetyl-Transférases).



## 2 - La famille des facteurs bHLH (basic-Helix-Loop-Helix)

La superfamille des protéines bHLH est représentée par sept groupes de facteurs de transcription initialement classifiés en fonction de leur répartition tissulaire (classes I à VII). Ils sont caractérisés par la présence d'une région composée d'acides aminés basiques (b), adjacente à deux hélices- $\alpha$  amphipathiques (H) séparées par une boucle flexible (L) de longueur variable.[547] La reconnaissance des motifs E-box (5'-CANNTG-3') par ces protéines permet de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans le développement embryonnaire et à la différenciation cellulaire. A ce jour, leur rôle dans l'activation des programmes de l'EMT reste assez mal compris ; différentes études ont cependant démontré une élévation du niveau d'expression de facteurs bHLH de **classe I** (TCF3/E12, TCF3/E47, TCF4/E2-2, TCF12/HEB) dans plusieurs contextes de migration des cellules épithéliales.[534, 536-537, 548-549]

Une interaction avec le motif E-box du gène *CDH1* n'a pu être observée que pour le facteur E47.[550] Les protéines de type TCF4/ITF2 (E2-2A et E2-2B) sont capables d'induire l'EMT dans les cellules rénales MDCK via une répression indirecte de la E-cadhérine, indépendamment des E-box. Toutefois, l'expression de ces molécules semble indispensable pour la répression transcriptionnelle par E47 ou SNAIL1.[549]

Les facteurs bHLH de **classe V** (ID-1 et ID-2 : *Inhibitors of DNA binding*) sont des membres atypiques de cette famille ; ils sont dépourvus de domaine basique et sont incapables de lier l'ADN.[475, 551] Ils agissent par oligomérisation avec les facteurs de classe I ou V (TWIST1/2) pour moduler positivement ou négativement leur activité de répression, en fonction des signaux extracellulaires et de leur régulation par des adaptateurs cytoplasmiques. En effet, la plupart des protéines bHLH sont régulées par différents partenaires spécifiques (co-activateurs et co-répresseurs : p300, Groucho, SIN3A...) susceptibles de recruter des complexes de compaction (HDACs) ou de relâchement de la chromatine (HATs).[534, 536]

Pour finir, des études récentes menées sur des tumeurs et des cellules transformées en culture ont permis de mettre en évidence un rôle pro-EMT pour les facteurs bHLH tissu-spécifiques de la **classe II** : **TWIST1** (Twist) et **TWIST2** (Dermo1) (*Drosophila Melanogaster Twist homologues*), caractérisés par un domaine C-terminal spécifique (Twist box).[276, 552-557] Au niveau embryonnaire, les protéines TWIST forment des hétérodimères avec les protéines bHLH de classe I pour participer à la spécification mésodermique et réguler les mouvements cellulaires à l'origine du développement crânio-facial.[276, 558]

Chez l'adulte, ils semblent jouer un rôle déterminant dans la survie cellulaire et la dispersion métastatique des carcinomes mammaires, hépatiques, prostatiques, ovariens et pulmonaires.[553, 557, 559-562] L'inhibition de TWIST1 par ARN interférence est à l'origine d'une diminution significative du nombre de cellules tumorales circulantes et de la suppression des métastases pulmonaires après injection de plusieurs lignées cellulaires hautement invasives (lignées 168FANR, 4TO7 et 4T1) dans la souris BALB/C.[553, 563-564] Ainsi, les fonctions de TWIST1 dans la tumorigénèse semblent s'exercer à plusieurs niveaux avec une participation aux étapes précoces de la transformation (inhibition de l'activité des suppresseurs de tumeur **P53** et **Rb**) mais aussi à la progression métastatique tardive (néoangiogenèse par régulation du **VEGF** ; activation des programmes de l'EMT et du maintien de la « pluripotence » ; participation aux mécanismes de résistance à l'anoïkis et aux drogues génotoxiques par stimulation des gènes anti-apoptotiques et pro-oncogéniques **BCL-2** et **AKT2**).[217, 554, 557, 565]

### 3 - La famille ZEB (Zinc E-box Binding factor)

Chez les vertébrés, la famille des facteurs de transcription ZEB (Zinc finger binding E-Box homeobox factors) regroupe deux homologues : ZEB1 ( $\delta$ EF1 ou TCF8) et ZEB2 (SIP1 ou ZFHX1B), caractérisés par des motifs conservés en «doigt-de-zinc» type  $C_2H_2$  ou type  $C_3H$  («Zn finger») et un **homéodomaine central (domaine HD)**. Ces protéines sont activées en réponse à de nombreux signaux extracellulaires (TGF $\beta$ , BMPs, ligands Wnt, Collagène I) ou intracellulaires (Ras/MAPKs, senseur d'hypoxie HIF-1- $\alpha$ ). Ils sont également induits sous le contrôle de divers facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, TCF/LEF, SNAIL1) de façon dépendante ou indépendante de la signalisation cytoplasmique.[534, 536, 566-570] (cf. figure 36)

Les motifs en «doigt-de-zinc» sont distribués dans deux domaines distincts présents au niveau des extrémités N- et C-terminales, ils se lient ensemble à l'ADN par un repliement du domaine central. Le domaine N-terminal (**Zn-N**) est caractérisé par la présence de trois motifs de type  $C_2H_2$  et un seul de type  $C_3H$ . Le domaine C-terminal (**Zn-C**), quant à lui, est constitué de trois motifs à «doigt-de-zinc» de type  $C_2H_2$ . [571-573] Ils agissent comme répresseurs transcriptionnels pour plusieurs gènes contenant une séquence E-box dans leur promoteur (gène *CDH1*, gènes codant les claudines, l'occludine, la desmoplakine et la plakoglobine). Chaque motif à «doigt-de-zinc» reconnaît un motif minimal CACCT sur l'ADN, et la séquence consensus complète est un élément bipartite composé des séquences 5'-CACCT-3' et 5'-CACCTG-3' dont l'orientation et la distance peuvent varier selon le gène concerné.[571-572] L'homéodomaine ne lie pas l'ADN mais permet de recruter des protéines adaptatrices (co-répresseur **CTBPs** : *C-Terminal Binding Proteins*) interagissant avec les facteurs de compaction de la chromatine (**HDAC1 et 2**).[569-570]

Une particularité des protéines ZEB est leur capacité à agir comme répresseurs ou activateurs de la transcription, en fonction des partenaires fonctionnels auxquels elles sont associées. En effet, ZEB1 possède, en plus de son site de liaison à CTBP, un domaine d'activation de la transcription et un site de liaison pour les co-activateurs **p300** et l'histone 2B - acetyltransférase **PCAF/KAT2B**. [569-570]

**ZEB2/SIP1**, fut d'abord caractérisé comme une protéine se liant au domaine MH2 des facteurs Smad2/3 (SIP1 : *Smad Interacting Protein 1*) et semble participer à la transmission du signal TGF $\beta$  de la membrane plasmique vers le noyau.[467, 572] **ZEB1/ $\delta$ EF1** ( *$\delta$ -crystallin Enhancer Factor 1*) a été initialement identifié comme une protéine nucléaire capable d'entrer en compétition avec le facteur bHLH E47 pour la liaison au motif E-box présent dans la région promotrice du gène codant pour la « $\delta$ 1- cristallin» chez le poulet (protéine spécifique du cristallin et de la cornée).[566] La protéine ZEB1 peut également interagir physiquement avec des Smads activés, mais de manière moins efficace que ZEB2. Une région en aval du motif Zn-N, conservée dans les deux protéines, permet l'interaction avec les Smads (**SBD** : *Smad Binding Domain*) et donc la régulation de l'expression transcriptionnelle des gènes de l'EMT.[568-570, 574]

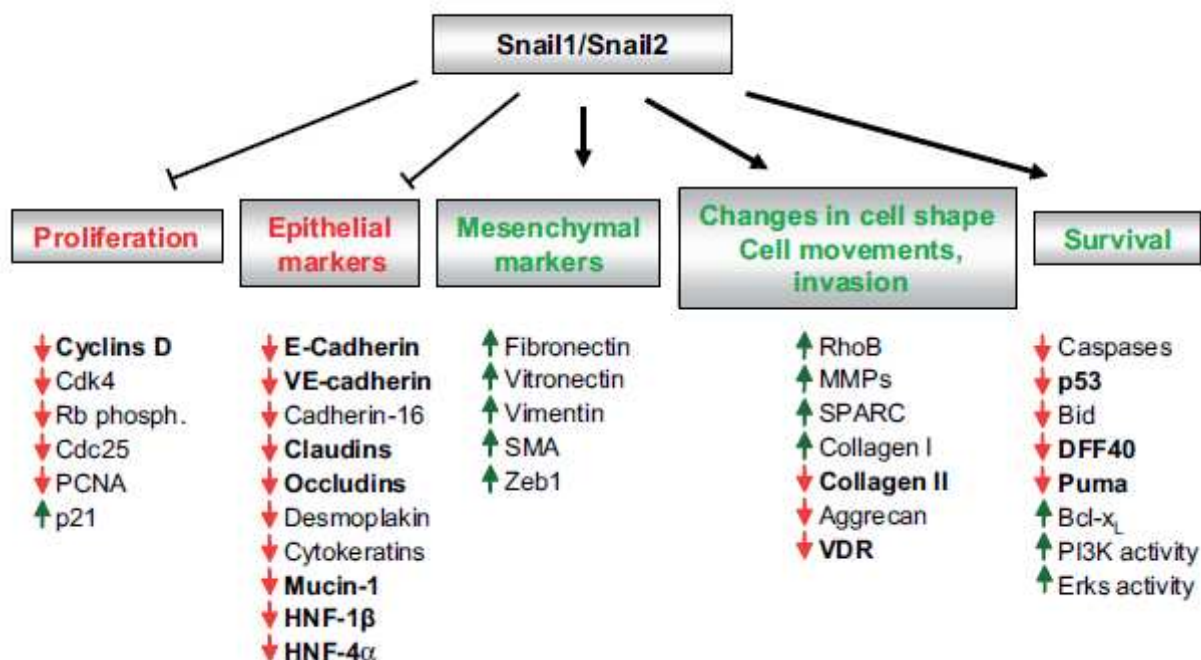
Dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, ZEB1 interagit directement avec Smad3 et SRF (*Serum Response Transcription Factor*) pour réguler positivement la transcription de l' $\alpha$ -SMA et des chaînes lourdes de myosine, en réponse au TGF $\beta$ . [475, 575]

Ainsi, les protéines ZEB exercent un rôle central dans les «switchs protéiques» associés à l'EMT (type 1, 2 et 3) en permettant à la fois une répression efficace de la E-cadhérine et une induction des protéines typiques des cellules fibroblastiques (N-cadhérine, vimentine, vitronectine, MMPs...)[570, 576] (cf. figure 36)

#### 4 - La superfamille SNAIL

Les membres de la superfamille SNAIL (*Drosophila Snail homologues*) sont des facteurs de transcription capables de lier l'ADN grâce à un motif conservé en «**doigt-de-zinc**» type **C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>** présent en position C-terminale (4 à 6 répétitions selon les homologues).[577] On retrouve deux sous-familles, SNAIL et **SCRATCH**, qui ont également en commun un domaine N-terminal **SNAG** (*SNAIL and Gfi-1 oncoprotein specific domain*) qui sert d'adaptateur moléculaire et leur permet (entre autres) d'interagir avec des co-activateurs (SIN3A, AJUBA) et de recruter des complexes de remodelage de la chromatine (HDAC1/2, CTBP1/2, PRC2). Chez les vertébrés, la sous-famille SNAIL est composée de trois membres : **SNAIL1** (SNAIL, SNAI1) et **SNAIL2** (SLUG, SNAI2), ainsi que **SNAIL3** (SMUC, SNAI3) dont les rôles spécifiques sont à ce jour encore assez mal connus.[138, 141, 577-587]

Parmi les EMT-TFs, SNAIL1 et SNAIL2/SLUG sont de loin les répresseurs du «protéome épithélial» les plus étudiés. Les différences de structure entre ces deux protéines permettent de moduler le niveau de répression qu'ils exercent sur les motifs E-box et donc l'amplitude de la réponse. Ainsi, l'affinité de SNAIL1 est plus forte que celle de SLUG pour ces motifs, le résultat étant une répression plus efficace de la transcription du gène *CDH1* et une meilleure dissociation des jonctions (et une réversibilité plus limitée).[537] Les promoteurs ciblés par les facteurs SNAIL sont nombreux et sont localisés en amont de gènes épithéliaux, mésenchymateux ou ubiquitaires.[538-539] (cf. figures 36 et 37)



**Figure 37 : Répression et activation transcriptionnelle par les protéines SNAIL.**  
D'après (Nieto, M.A. ; 2008) [535]

Les facteurs de transcription SNAIL1 et SNAIL2 sont capables de réprimer directement l'expression des marqueurs épithéliaux (*epithelial markers*) et d'activer indirectement les gènes de la migration (*mesenchymal markers, changes in cell shape...*). De plus, l'activation de ces facteurs est associée à des fonctions anti-prolifératives (*proliferation*) et anti-apoptotiques (*survival*). Il est important de noter que les variations dans l'expression de ces gènes cibles ne sont pas simultanées mais répondent à des événements cinétiques complexes au cours desquels il n'est pas rare d'observer des phénomènes de «yoyo» avec une alternance de régulations positives et négatives pour un gène ou un ARNm donné.[539, 588]



SNAIL1 possède une affinité très élevée pour les motifs E-box et sa transfection dans des modèles cellulaires peut être suffisante pour affecter la plupart des gènes codant les protéines des jonctions serrées, adhérentes et desmosomales.[535, 539, 548] De façon intéressante, la liaison de SNAIL1 au promoteur de la E-cadhérine peut être renforcée par une interaction physique avec Smad3/4, également fixé au promoteur du gène *CDH1* au niveau des sites SBE (*Smad Binding Elements*) adjacents aux motifs E-box.[589] Les co-répresseurs associés à cette régulation négative interagissent avec le domaine SNAG ; on trouve les protéines **SIN3A** et **AJUBA** capables de recruter les complexes **HDAC1/2** et **PCR2** (*Polycomb group Proteins, member 2 / H3K<sub>27</sub>-triméthylase*), respectivement. Les HDACs et PRC2 sont des facteurs catalysant des modifications post-traductionnelles des histones reconnues par d'énormes complexes moléculaires qui assurent la conversion de l'euchromatine en hétérochromatine, plus compacte.[536, 538, 590-591]

Il est important de noter que les modifications des lysines sur la queue N-terminale des histones définit un code complexe (**code histone** ou code épigénétique) qui ne peut en aucun cas être réduit à une interprétation de type « acétylation = activation / méthylation = répression ».[540] Par exemple, la compaction de la chromatine est régulièrement associée à la présence des histones modifiées H3mK<sup>9</sup> et H3mK<sup>27</sup> (Histone H3 méthylée sur les lysines K<sup>9</sup> et K<sup>27</sup>), alors que les formes H3mK<sup>4</sup>, H3mK<sup>36</sup> et H3mK<sup>79</sup> sont plutôt caractéristiques de la chromatine active (euchromatine). Il a récemment été démontré que la fixation de SNAIL sur le motif E-box du gène *CDH1* permet de recruter le complexe LSD1/CoREST par une interaction avec le domaine SNAG. LSD1 (*Lysine Specific Demethylase-1*) est responsable de la perte du méthyl en K4 de l'histone H3 et permet d'initier la compaction de la portion chromosomique concernée.[592]

A l'inverse, l'expression ectopique des protéines SNAIL peut être associée à l'induction de la transcription de gènes mésenchymateux, de manière directe (association avec des co-activateurs et des HATs), ou sous l'effet d'une coopération avec d'autres facteurs de transcription. En effet, une des cibles transcriptionnelles de SNAIL1 est le gène encodant la protéine ZEB1, capable d'activer directement la transcription de la N-cadhérine et de la vimentine.[593] Ainsi, une fois que **ZEB1** est induit, une diminution de l'expression de SNAIL par ARN interférence s'avère inefficace pour restaurer un phénotype épithélial. Comme décrit précédemment, la perte membranaire de la E-cadhérine peut également être un évènement suffisant pour induire la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et du facteur NF- $\kappa$ B dans de nombreux contextes cellulaires et *in vivo*. Ainsi, la répression du gène *CDH1* par SNAIL ou SLUG peut entraîner une activation secondaire des gènes cibles du complexe **TCF/LEF** ou de la signalisation **NF- $\kappa$ B**. [495, 536, 594-595] De plus, SNAIL1 régule l'expression du récepteur à la **vitamine D**, un activateur de la transcription de *CDH1*. [596-598] Réciproquement, une surexpression de la E-cadhérine tend à s'opposer à l'activation transcriptionnelle de SNAIL1 ainsi qu'à l'induction de l'EMT et d'un phénotype migratoire, notamment par la restauration d'un niveau basal d'expression de la MAP Kinase **ERK2**. [138, 536, 599] Il est toutefois important de noter que les jonctions adhérentes matures sont des éléments extrêmement stables, en particulier lorsque l'ancrage des microfilaments est stabilisé par les caténines  $\alpha$  et P120. Ainsi, le nombre de lignées cellulaires dans lesquelles la simple surexpression de SNAIL permet d'induire l'EMT est plutôt limité et il est probable que des évènements de «priming» (altération préalable des jonctions cellulaires) s'avèrent nécessaires pour permettre une répression transcriptionnelle efficace de ce facteur.[536]

## C. Régulation de l'expression de *SNAIL1* au cours de l'EMT

### 1 - Expression physio-pathologique de *SNAIL1*

Le gène *SNAIL1*, situé sur le chromosome 20 chez l'homme (*locus 20q13.2*), est généralement considéré comme éteint dans les cellules épithéliales différenciées.[600] La protéine Snail (codée par le gène *Snai-1*) apparaît dans l'embryon murin au 7ème jour de développement (E6,5-E7) et joue un rôle primordial dans l'EMT associée à la mise en place du mésoderme. Son invalidation génique par KO est associée à un arrêt du développement au stade de la gastrulation et les embryons atrophiques meurent prématurément des suites d'une absence de développement de nombreuses structures. De façon intrigante, les embryons *Snai*<sup>-/-</sup>, bien que chétifs à E8,5, sont constitués de trois feuillets et on peut observer la présence de cellules mésodermiques exprimant partiellement la E-cadhérine (niveau d'expression intermédiaire entre celui des cellules ectodermiques et mésodermiques des embryons contrôles).[601-602] Pendant la délamination des crêtes neurales, l'expression de *SNAIL* à des niveaux élevés est indispensable à la protection des cellules en migration contre les signaux-pro apoptotiques.[603] (*cf. figures 38A et B*)

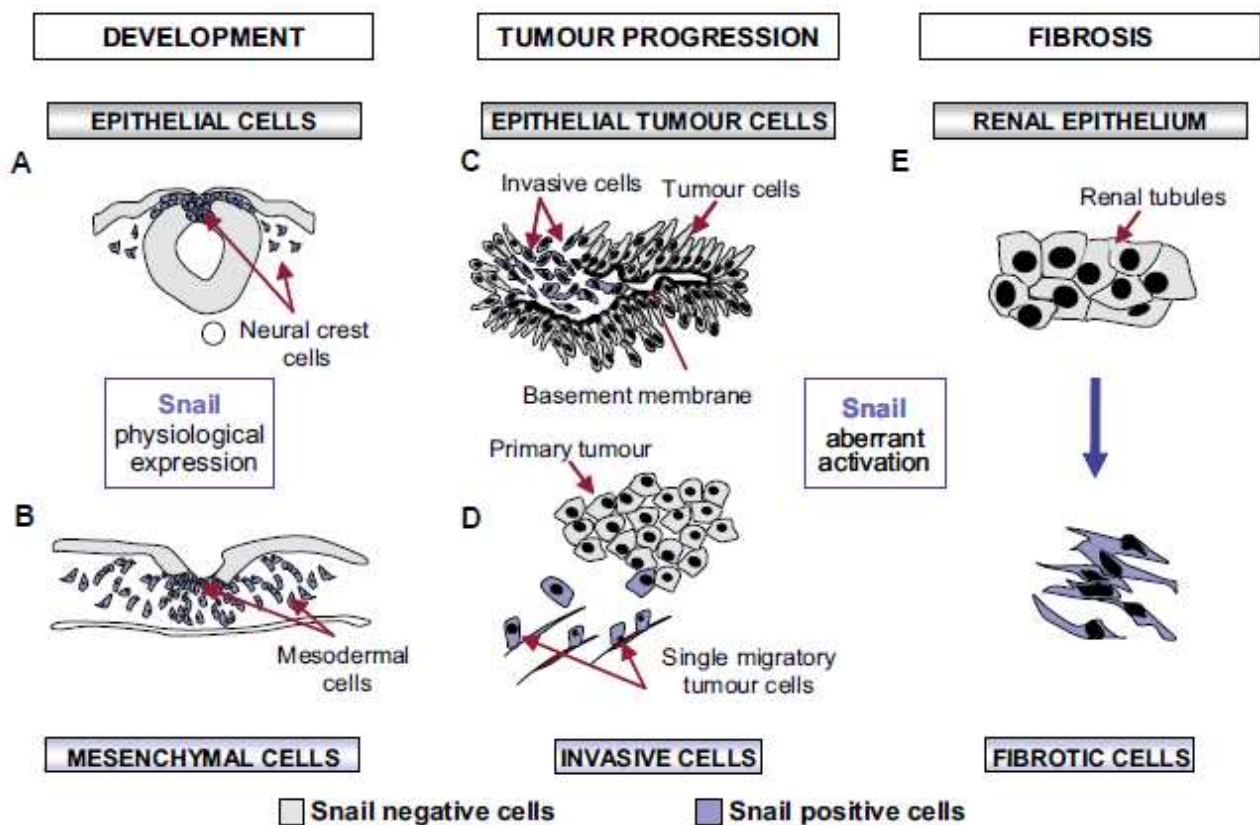


Figure 38 : Expression de la protéine *SNAIL1* au cours de l'EMT type 1, 2 et 3.

D'après (Nieto, M.A. ; 2008) [535]

(A) Délamination des crêtes neurales (*EMT1*). (B) Formation du mésoderme au cours de l'étape de gastrulation (*EMT1*). (C) Front invasif des carcinomes infiltrants (*EMT2*). (D) Cellules cancéreuses motiles individualisées de la masse tumorale (*EMT2*). (E) Conversion des cellules épithéliales en fibroblastes inflammatoires dans les fibroses rénales.

Dans la plupart des lignées métastatiques, une réactivation du gène *SNAI1* est associée à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur (PTEN, P53, BCL-XL, BID...), à des phénotypes de résistance contre divers agents génotoxiques, ou encore à l'apoptose induite par les rayons ionisants et des cytokines.[603-605] De plus, SNAIL1 est exprimé au niveau du front invasif dans les biopsies de cancers du sein, généralement en relation avec un mauvais pronostic (présence de ganglions, dispersion métastatique, perte de la E-cadhérine et du récepteur à l'œstrogène ER- $\alpha$ ).[606-610] Son induction est également associée aux processus de rechute après rémission, en lien avec sa capacité à induire une dédifférenciation et la perte d'expression de certains antigènes («immuno-editing») et une immunosuppression.[608, 611] Enfin, une activité pro-angiogénique a également été décrite pour SNAIL1, faisant de cette protéine un élément central de l'EMT de type 3 et de la progression métastatique des carcinomes.[141, 536, 612]

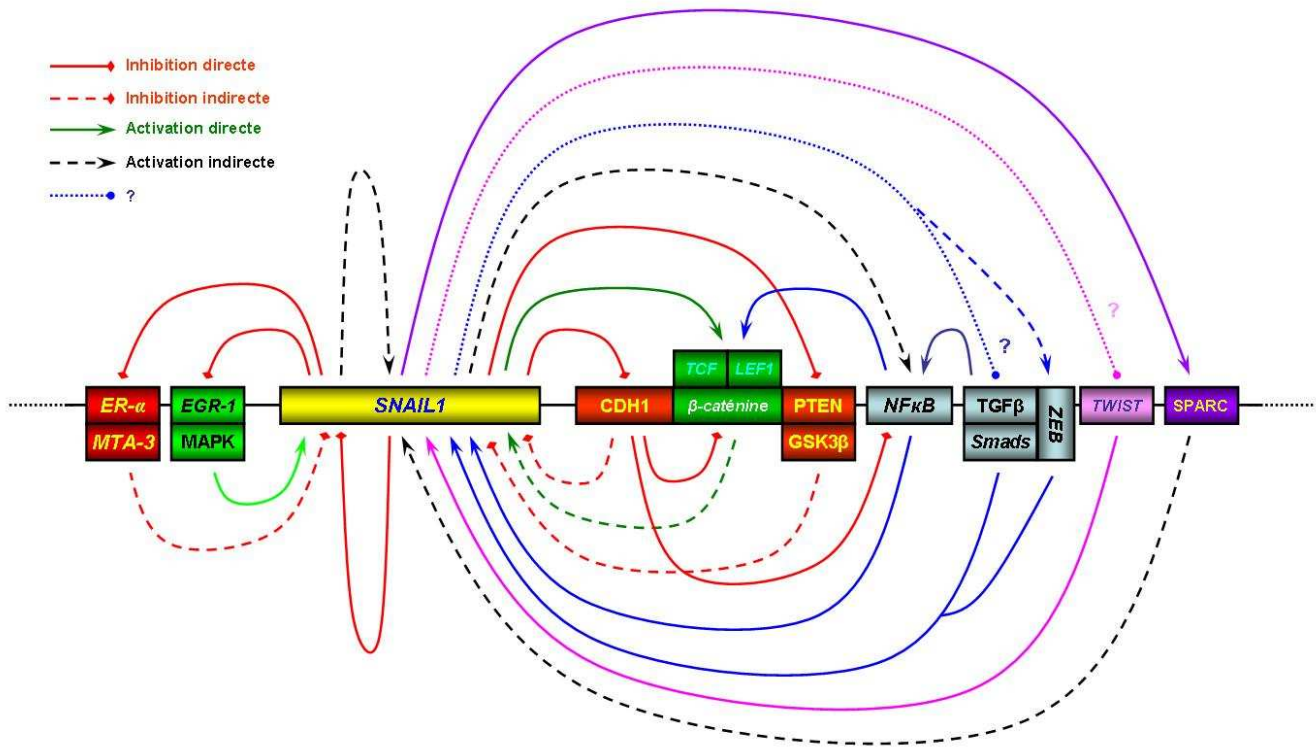
Au cours de l'EMT de type 2, les fonctions de SNAIL1 ont été largement étudiées dans les modèles de fibroses rénales et ce facteur joue un rôle déterminant dans l'expression des marqueurs fibroblastiques et dans l'entretien du processus inflammatoire.[478, 613-614] (*cf. figures 38C, D, E*)

## 2 - Régulation transcriptionnelle du gène *SNAI1*

Au cours de l'EMT, l'expression de SNAIL1 peut être induite par des protéines de la MEC (laminine), en réponse à de nombreuses cytokines (TGF $\beta$ , BMPs, FGF, HGF, EGF, PDGF, VEGF) ou sous l'effet d'une réponse inflammatoire (PGE2 : *Prostaglandine E2* ; COX2 : *Cyclooxygénase2* ; NF- $\kappa$ B) ou hypoxique (HIF-1 $\alpha$ , ROS : formes réactives de l'O<sub>2</sub>...). De manière générale, il existe une relation étroite entre les cibles transcriptionnelles de SNAIL1 et les systèmes de régulation de son promoteur, générant ainsi des boucles de rétrocontrôle extrêmement complexes.[534, 536, 615]

En effet, au cours de l'EMT, l'activité inductrice de SNAIL1 peut être amplifiée par des rétrocontrôles positifs dans lesquels des protéines conduisant à l'activation de son promoteur sont elles-mêmes des cibles d'activation de SNAIL1 (cas de l'ostéonectine **SPARC** : *Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine*).

A l'inverse, elle peut aussi être atténuée sous l'effet de la présence de motifs E-box dans la séquence promotrice de plusieurs de ces protéines activatrices. Par exemple, le facteur **EGR-1** (*Early Growth Response 1* : *facteur à «doigt-de-zinc» type C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>*), est exprimé précocement au cours de l'EMT induite par l'**HGF** et les MAPKinases ; il régule positivement SNAIL1 mais peut faire l'objet d'une répression secondaire à l'expression de ce même facteur.[536, 539, 548, 616-617] (*cf. figures 35, 36, 37 et 39*)



**Figure 39 : Boucles de rétrocontrôle de l'activité de SNAIL1 au cours de l'EMT.**

D'après (De Craene, B. *et al.* ; 2005) & (Herreros, A.G. *et al.* ; 2010) [536, 615]

Ce schéma reprend les différentes interactions existant au niveau transcriptionnel entre SNAIL1 et les nombreuses molécules régulant la signalisation cellulaire de l'EMT. Il est important de noter que plusieurs de ces boucles de rétrocontrôle ne sont pas systématiquement mises en jeu ensemble dans un même contexte cellulaire. En effet, si l'activation du promoteur *SNAIL1* est un événement redondant pour les EMT de type 1, 2 et 3 ; ce n'est pas forcément le cas pour les régulateurs de cette séquence et les cibles transcriptionnelles de la protéine SNAIL1. Ainsi, les boucles de régulation de l'activité de SNAIL1 dépendent fortement de la formation de complexes macromoléculaires dont les composants définissent des « combinaisons spécifiques » responsables des « oscillations » entre des effets activateurs et inhibiteurs. Cet équilibre dynamique est également sous la dépendance d'événements cinétiques coordonnés dont le but est de permettre une transition rapide entre un phénotype cellulaire cohésif (épithélial) et une forme cellulaire pro-migratoire (cellule mésenchymateuse/fibroblaste). L'expression de la **E-cadhérine** (CDH1), la stabilité des jonctions adhérentes et les inhibiteurs de la **voie Wnt** (PTEN, GSK3β...) sont au cœur de ce système, sous l'effet de la séquestration membranaire de la **β-caténine** et de l'inhibition de l'activité de **TCF/LEF**. L'activation, la stabilisation ou encore la localisation de plusieurs facteurs de transcription (*noms en italique dans le schéma*) sont également directement impliquées dans la stimulation ou la répression du promoteur *SNAIL1* : les protéines des familles **EGR**, **NF-κB**, **Smad**, **ZEB** et **TWIST** sont généralement considérés comme des régulateurs positifs de la séquence promotrice *SNAIL1* ; leur activité est réciproquement modulée de façon directe ou indirecte par l'expression de SNAIL1 au cours de l'EMT. SNAIL1 est également capable de lier et réguler négativement ou positivement son propre promoteur ; cette « balance » dépend du contexte cellulaire et probablement de l'interaction directe avec d'autres co-facteurs (NF-κB, β-caténine, Smads...). Dans les cellules épithéliales différenciées, l'expression de SNAIL1 est généralement maintenue à des niveaux faibles, en partie sous l'effet d'une boucle de rétrocontrôle négatif avec le récepteur nucléaire aux œstrogènes **ER-α** en association avec **MTA-3** (à noter que cette signalisation dépend fortement du type d'épithélium et de sa sensibilité aux hormones sexuelles qui peuvent être des inducteurs de l'EMT ou de la MET en fonction du contexte : dans la glande mammaire, les effets de l'activation des récepteurs ER-α et PGR-α semblent plutôt associés à un maintien du phénotype épithélial). Enfin, **SPARC** est une protéine sécrétée dont la régulation est indirectement corrélée avec l'expression de SNAIL1, les liens moléculaires entre ces deux protéines ne sont pas encore totalement clarifiés.

## 2.1. Rétrocontrôles positifs

- **Voie TGF $\beta$**  : *in vitro*, la transcription de SNAIL est fortement induite en réponse au TGF $\beta$  grâce à une interaction directe des complexes Smads activés avec un élément de réponse SBE, contenu dans le promoteur *SNAIL*. Dans cette région promotrice, le motifs SBE (5'-CAGACA-3') est adjacent à des séquences riches en répétitions A-T qui permettent une coopération des Smads avec le facteur HMGA2 pour activer la transcription de SNAIL1 au cours de l'EMT dans les cellules en culture.[618]
- **Voie MAPK** : une activation aberrante de la voie Ras/MAPKinases peut être à l'origine d'une régulation positive du gène *SNAIL*, de manière indépendante de la signalisation extracellulaire.[534-535, 615] Sous le contrôle de cette signalisation, SNAIL1 peut se lier à des protéines susceptibles de contrôler sa transcription : une interaction physique a été démontrée pour les facteurs EGR-1 et AP-1 (*Activated Protein-1*).[619] La séquence flanquée en 5' du gène *SNAIL* présente des sites «AP» reconnus respectivement par les facteurs «leucine-zipper» FOS/JUN (AP-1) et TFAP2A (AP-2), impliqués notamment dans la régulation des gènes encodant la MMP-9 ou le collagène I, au cours des étapes précoces de l'EMT.[534, 539, 620-621]
- **Voie Wnt/ $\beta$ -caténine** : chez certaines espèces, les promoteurs *SNAIL* et *SNAIL2/SLUG* contiennent un site de liaison au facteur LEF-1 (**LBS** : *LEF Binding Site*), permettant au complexe  $\beta$ -caténine/TCF/LEF d'exercer une régulation positive directe.[615, 622-623] Cette séquence n'est pas conservée dans les promoteurs des gènes murin (*Snail*) et humain (*SNAIL*), mais une régulation LBS-indépendante peut intervenir au cours de l'EMT.[615, 622, 624] Dans la lignée murine SW480 (cellules épithéliales du colon), l'activation ectopique du complexe  $\beta$ -caténine/Tcf/Lef aboutit à la stimulation du promoteur de Slug/Snai2 (en l'absence de LBS) mais n'a aucun effet sur celui de Snail1. Dans ces cellules, l'expression de Snail1 est en revanche régulée positivement par la voie des intégrines, via la kinase ILK.[625] De manière plus indirecte, la coordination entre la perte de la E-cadhérine et la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine est responsable d'une induction de SNAIL1. En effet, le maintien des jonctions adhérentes par stimulation du gène *CDH1* est associé à une répression de SNAIL1 dans plusieurs modèles ; l'activation de la voie Wnt et la perte du pool membranaire de  $\beta$ -caténine vont donc dans le sens d'une amplification rapide des effets de SNAIL1, sous l'effet d'une boucle de rétrocontrôle positif.[534, 536] Toujours dans ce sens, la phosphatase PTEN et la kinase GSK3 $\beta$  représentent, avec l'axine, les « remparts cellulaires » majeurs de l'induction de la voie des ligands Wnt.[457, 510] (*cf. partie D*) L'inhibition chimique de GSK3 $\beta$  est accompagnée d'une activation du promoteur *SNAIL* dans plusieurs lignées ; SNAIL1 est de plus capable de réprimer directement PTEN dans les cellules MDCK.[510, 605] (*cf. figure 39*) Ce système est d'autant plus complexe que la protéine SNAIL1 est capable d'interagir physiquement avec la  $\beta$ -caténine pour amplifier son action sur les gènes cibles de la voie Wnt dans la lignée SW480 (expression évaluée par le système rapporteur TOP/FOP et l'expression transcriptionnelle de l'axine2 et Dishevelled-2).[626]

- **Voie NF- $\kappa$ B** : l'induction des facteurs de la famille REL, sous le contrôle de la kinase IKK, est également un élément central des boucles d'auto-amplification de l'activité de SNAIL1 et de la régulation positive des gènes « mésenchymateux » au cours de l'EMT. En effet, NF- $\kappa$ B est considéré comme un inducteur de la transcription pour la vimentine et la MMP9 ; ce facteur interagit directement avec le promoteur de SNAIL1 au niveau d'une séquence conservée (*nucléotides -194 à -78*).[495, 627] Réciproquement, NF- $\kappa$ B est une cible transcriptionnelle régulée positivement par SNAIL1 ; ses effets pro-EMT sont, comme pour la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, dépendants de l'expression de la E-cadhérine.[594]

- **Voie PDGF** : dans les cellules humaines SW480 (colon), le traitement PDGF a pour conséquence la phosphorylation activatrice de la **p68-RNA hélicase** (sur le résidu Y593), un adaptateur moléculaire pour de nombreuses protéines nucléaires. La p68 activée déplace le complexe **HDAC-1/Mi-2/NuRD** (*Mi-2 : MBD3 : Methyl-CpG Binding Domain Protein-3 ; NuRD : Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation complex*) présent sur le promoteur *SNAIL* ; ceci permet son acétylation, sa décompaction et donc son activation.[628] Toujours sous le contrôle du PDGF, la protéine p68 intervient également dans la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine en favorisant sa dissociation par rapport à l'axine.[629]

- **Autres régulateurs transcriptionnels** : au cours de la formation du mésoderme chez la drosophile, les facteurs **Twist** et **Dorsal** agissent comme des activateurs majeurs de la transcription de SNAIL1, en opposition avec la protéine **Nodal**, qui semble au contraire intervenir comme répresseur.[615, 630] Une autre caractéristique intéressante du promoteur *SNAIL* est la présence d'une séquence **FTS-1** (*Fibroblast Transcription Site-1*), pouvant potentiellement faire l'objet d'une activation par le complexe CBF dans les fibroblastes, comme pour le gène encodant FSP-1/S100A4.[541] Cette séquence est également présente dans le promoteur des gènes *HMGA2*, *Dorsal* et *TWIST*. [124, 543, 615] Enfin, le gène *SNAIL* est flanqué d'une séquence **HS-3'-enhancer** (*HS : DNase Hypersensitive Sites*) dont l'interaction avec la région promotrice (par repliement sur trois autres sites HS) semble déterminant pour son induction dans les cellules de mélanomes (lignée A375). Ce motif est reconnu par le complexe **ETS/YY1** (*Yin Yang 1 transcription factor*), qui pourrait agir par recrutement des facteurs de remodelage chromatinien CBP/p300 (*famille des histone-acétyltransférases*) et PRMT1 (*Protein-Arginine-MethylTransferase-1*).[631-632]

## 2.2. Rétrocontrôles négatifs

Dans les cellules épithéliales différenciées, SNAIL1 est au contraire soumis à une répression active, nécessaire au maintien des complexes jonctionnels et à la sécrétion des composants de la lame basale. Dans l'épithélium mammaire, l'activation du récepteur aux œstrogènes **ER- $\alpha$**  semble jouer un rôle déterminant dans ce processus. En effet, la perte de ce récepteur dans les cellules tumorales pourrait être en partie responsable de l'expression ectopique des facteurs SNAIL associée à la dispersion métastatique et à l'acquisition du potentiel de résistance à l'apoptose.[532, 586] De même, l'expression de la protéine **MTA-3** (*Metastasis Associated family 1, member 3*), une sous-unité du complexe de co-répression **Mi-1/NuRD** (*Mi-1 = CHD : Chromodomain Helicase DNA binding protein*), est associée à un niveau d'expression faible de SNAIL1 et au maintien de la polarité apico-basale en réponse au récepteur ER- $\alpha$ . [633-634]

La stimulation de la signalisation des œstrogènes dans les cellules tumorales mammaires MCF7 (lignée positive pour l'expression de ER- $\alpha$ ) est associée à une répression de SNAIL1. Réciproquement, l'expression ectopique de SNAIL dans ces cellules diminue de façon significative la transcription de ER- $\alpha$  par une association directe à son promoteur (*séquence ESR1*) ; ces effets sont associés à une activation des composants de la voie TGF $\beta$  canonique et non canonique.[532] De façon intéressante, les œstrogènes sont également des activateurs de l'EMT via la transcription du facteur **ZEB-1** dans plusieurs contextes cellulaires ainsi que dans les tumeurs de l'endomètre utérin et des ovaires.[635-638]

Une telle relation antagoniste n'est pas exceptionnelle puisque, même au cours de l'EMT, l'expression de SNAIL1 est soumise à une certaine «tempérance» sous l'effet de boucles négatives dont le but physiologique est probablement de faciliter le retour rapide à un état cellulaire cohésif par **MET**. Cette coordination chronologique s'avère déterminante au cours du développement embryonnaire.[536, 639-640]

Ainsi, dans les cellules mammaires de la lignée HMEC traitées au TGF $\beta$ , on observe une induction rapide du niveau de transcrit SNAIL1, suivie d'une stagnation, voire d'une diminution. Si le traitement est prolongé sur une période supérieure à 6 jours, on observe alors l'induction de « facteurs tardifs » (ZEB2/SIP1, **GSC** : *Goosecoid* homologue et **FOXC2** : *mesenchyme Forkhead box C2*) et une nouvelle augmentation du niveau de SNAIL1 associée à l'expression des marqueurs de dédifférenciation (CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>).[588]

Cet aspect cinétique peut également être observé dans les cellules MCF7, dans lesquelles la transfection de SNAIL1 induit sa propre activation uniquement pendant 24-48h. Dans un deuxième temps, le niveau d'expression des transcrits SNAIL1 semble revenir à l'état basal au bout de 72h.[539] (*cf. figure 39*)

### 2.3. Boucles d'auto-régulation

Le point le plus intrigant en ce qui concerne la structure du promoteur *SNAIL* est le degré élevé d'homologie qu'il possède avec celui de sa cible principale : le gène *CDH1*. En effet, en amont de la séquence codante du gène humain *SNAIL*, on trouve **4 motifs E-box**, dont le plus proximal est conservé chez le macaque rhésus, le bœuf, la souris, le rat, la drosophile et le poisson-zèbre (*Danio Rerio*). Toujours dans les cellules SW480, SNAIL1 (exprimé de façon ectopique), est capable de réprimer sa propre séquence promotrice tout en induisant la répression de la E-cadhérine et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux.[639] Comme pour le TGF $\beta$ , cet « auto-rétrocontrôle négatif » semble destiné à limiter la durée d'action du répresseur SNAIL1 sur les gènes épithéliaux et faciliter la réversibilité de l'EMT par MET.

Au contraire, dans la crête neurale, Slug (qui lie son propre promoteur au niveau d'une E-box) exerce un rétrocontrôle positif sur sa transcription. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle les facteurs de la famille SNAIL pourraient exercer un contrôle aussi bien négatif que positif sur la transcription, en fonction des co-régulateurs auxquels ils sont associés.[641] Des études récentes suggèrent en effet que la «direction» dans laquelle s'oriente cette auto-régulation est fortement dépendante du contexte cellulaire, en particulier du niveau d'expression de la E-cadhérine et du pool membranaire de  $\beta$ -caténine (notion de « priming » des cellules pour l'induction de l'EMT). Enfin, on peut noter qu'une des E-box du promoteur *SNAIL* est adjacente au **site SBE**, comme c'est le cas pour *CDH1*. Ainsi, il est probable que SNAIL1 puisse agir en coopération avec les Smads pour réprimer ou activer sa propre transcription.[536, 626, 639] (*cf. figure 39*)



### 3 - Régulation post-transcriptionnelle par les miRNAs

L'étude des micro-ARNs régulateurs (miRNA ou miR) représente l'un des nouveaux axes de recherche dans la compréhension des voies de signalisation gouvernant les programmes cellulaires de l'EMT. Ce sont de petits ARNs non codants de 21-23 nucléotides, capables de lier des ARNm dans le but de limiter leur traduction. Ils agissent essentiellement par recrutement de **RISC** (*RNA-Induced Silencing Complex*) pour former un complexe **miRNP** qui digère les ARNm grâce à son activité RNase.[642-644] A ce jour, leur rôle est majoritairement étudié dans les processus de tumorigenèse (transformation, dédifférenciation et dispersion métastatique) ; mais il semble que leurs effets soient relativement pléiotropiques et qu'ils puissent agir tout au long du développement chez de nombreuses espèces.[645-648] Ces molécules ciblent des gènes très divers et pourraient jouer un rôle déterminant dans plusieurs étapes de l'EMT, notamment via la régulation de l'expression des facteurs de transcription.[649-652]

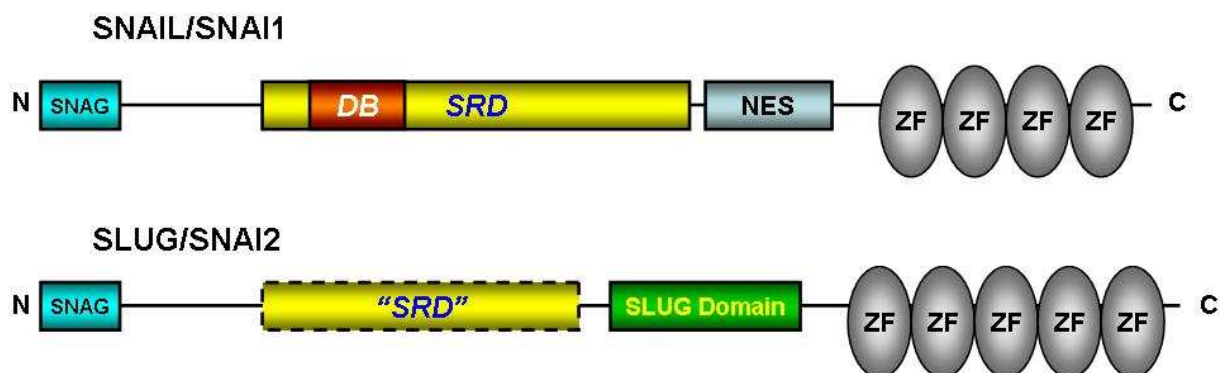
Plusieurs composants de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont inhibés par des miRNAs : par exemple, le **miR-200a** cible directement le **3'UTR** (*UnTranslated Region*) de l'ARNm de la  $\beta$ -caténine, inhibant ainsi la transcriton par TCF/LEF.[653] A l'inverse, les **miR-135** (a et b) et **miR-21** ciblent respectivement les 3'UTRs des transcrits APC et PTEN, activant donc la transcription des gènes cibles de la voie Wnt.[654-656] L'inhibiteur de la voie Wnt Kremen2 et les ligands antagonistes du récepteur Frizzled (Dkk1 : *Dickkopf xenopus laevis* homolog-1 et sFRP2 : *secreted Frizzled-Related Protein-2*) sont également ciblés par le **miR-29a**, ce qui aboutit à une réponse cellulaire amplifiée sous l'effet des ligands Wnt.[657]

Cette régulation concerne également les facteurs de la famille ZEB qui sont régulés négativement par les ARNs de la famille **miR-200** (*miR-141*, *miR-200a*, *b*, *c* et *miR-205*).[649, 658-659] La stabilité de la protéine SLUG est au contraire régulée positivement par le **miR-221** qui inhibe la transcription du gène codant la E3 ubiquitine ligase MDM2.[660-661] Il est probable que la régulation de la stabilité des ARNm SNAIL1 soit également soumise à des contrôles similaires par de telles molécules et fasse donc l'objet de nombreuses études au cours de la prochaine décennie. Récemment, une analyse comparative des données transcriptomiques de 295 biopsies de cancers du sein, a permis de démontrer que l'expression de SNAIL1 est corrélée à une élévation de la synthèse du **miR-661** et à la répression de ces cibles : la Nectine-1 (protéine membranaire associée aux jonctions adhérentes) et le transporteur lipidique StarD10. Ainsi, l'activité de répression de SNAIL1 n'est pas limitée à son interaction avec les E-box mais peut s'exercer indirectement par des régulations post-transcriptionnelles.[662]

#### 4 - Régulation post-traductionnelle

*In vivo*, l'activation transcriptionnelle du promoteur *SNAIL* est loin d'être un évènement suffisant pour déclencher la répression des gènes sous le contrôle des E-box. En effet, à des niveaux d'expression modérés (c'est-à-dire en dehors des systèmes de surexpression dans les cellules en culture), la protéine SNAIL1 néo-synthétisée est soumise à des mécanismes de contrôles post-traductionnels qui en font une protéine fortement instable possédant une demi-vie de 20 à 45 minutes. Ces modifications des acides aminés agissent sur son activité répressive, sa localisation cellulaire et sa stabilité ; elles peuvent intervenir tout au long de la séquence protéique de SNAIL1 mais se concentrent essentiellement dans la portion centrale entre les domaines SNAG (N-terminal) et «doigt-de-zinc» (C-terminal).[536, 663-665] (*cf. figure 40*)

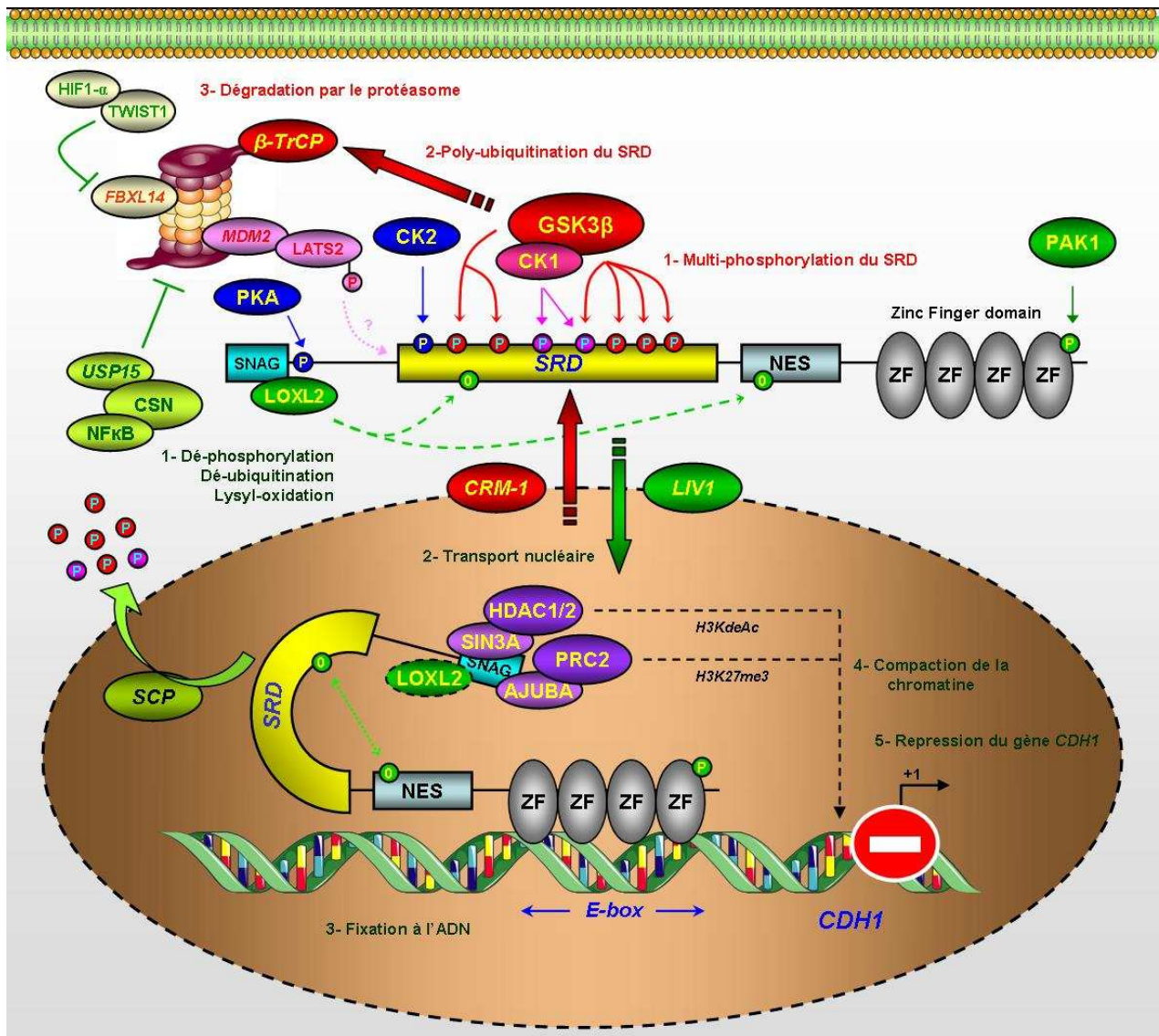
Le domaine central est une région qui diffère entre les membres de la famille SNAIL. Au niveau de cette portion variable, SLUG est caractérisé par une série de 29 acides aminés non conservés, juxtaposés au domaine en «doigt-de-zinc». Le rôle exact de ce « domaine SLUG » est encore inconnu à ce jour, mais les résidus qui le composent semblent intervenir dans l'oligomérisation des protéines SLUG, qui paraît être nécessaire à sa liaison à l'ADN.[537, 602] La protéine SNAIL1 est au contraire organisée autour de deux domaines fonctionnellement distincts mais soumis à une régulation post-traductionnelle coordonnée : le signal d'export nucléaire (NES : *Nuclear Export Signal*) et le domaine SRD (*Serine Rich Domain*) juxtaposé à un motif de reconnaissance par le protéasome (DB : *Destruction Box*).[536, 666] (*cf. figure 41*)



**Figure 40 : Organisation structurale des protéines SNAIL et SLUG.**

D'après (Peinado, H. *et al.* ; 2007) [534]

Les 7 acides aminés en position N-terminale sont conservés chez tous les membres de la famille SNAIL quelle que soit l'espèce étudiée. Ils constituent le domaine **SNAG** (*SNAI and Gfi conserved*) qui sert de « plateforme moléculaire » pour l'interaction avec de nombreuses protéines, en particulier des cofacteurs de répression transcriptionnelle (SIN3A, AJUBA) et des complexes de remodelages de la chromatine (HDACs, groupe Polycomb...). Le domaine C-terminal de liaison à l'ADN (**ZF** : *Zinc Finger*) est également conservé, il est formé de motifs répétés en nombre variable (4 pour SNAIL et 5 pour SLUG). Par contre, le domaine central diverge fortement entre les membres de la famille SNAIL : SNAIL1 contient une séquence d'export nucléaire (**NES** : *Nuclear Export Signal*) et un domaine riche en sérines et prolines (**SRD**) abritant un motif de reconnaissance par les ubiquitine-ligases et le protéasome (**DB** : *Destruction Box*). SLUG contient également de nombreuses sérines mais ne semble pas posséder de véritable SRD capable de réguler sa stabilité ; la séquence NES est remplacée par un « domaine SLUG » dont le rôle demeure énigmatique.



MPRSFLV RKPS<sup>11</sup>DPNRKPNYSELQDSNPEFTFQQPYDQAHLLAAIPPPEILNPTASLPMLIWDSVLAPQAQPIA  
 WASLRLO ES<sup>82</sup>PRVAELTSL S<sup>92</sup>DEDS<sup>96</sup>GK<sup>98</sup>GS<sup>100</sup>QPPS<sup>104</sup>PPS<sup>107</sup>PAPS<sup>110</sup>SFSS<sup>115</sup>TSVS<sup>119</sup>S LEAEAYAAFPG  
 LGQVPK<sup>137</sup>QLAQLSEAK<sup>146</sup>DLQARK AFNCKYCNKEYLSLGALKMHRSHTLPCVCGTCGKAFSRPWLLQGHV  
 RTHTGKPFSCPHCSRAFADRSNLRHLQTHSDVKKYQCQACARTFS<sup>246</sup>RMSLLHKHQESGCSGCGPR  
 S GSK3 S CK1 S GSK3 + CK1 P PKA S CK2 S PAK1 K/K LOXL2/β-TrCP

**Figure 41 : Régulation post-traductionnelle de la stabilité, la localisation et l'activité de SNAIL1.**  
 D'après (Herreros, A.G. et al. ; 2010) [536]

Ce schéma combine des données obtenues dans des cellules issues de plusieurs espèces et il est probable que certains de ces mécanismes ne soient pas entièrement conservés par l'évolution. La présence de plusieurs résidus est cependant redondante ; c'est le cas notamment de la plupart des **sérines** (S) et des **lysines** (K) dont la position varie très peu entre *Danio Rerio*, *Xenopus Laevis*, *Drosophila Melanogaster*, *Mus Musculus*, *Rattus Norvegicus* et *Homo Sapiens*. Ces acides aminés, en association avec une séquence **NES** (Nuclear Export Signal : en bleu clair), permettent une coordination de la localisation, la stabilité et l'activité transcriptionnelle de SNAIL1. Ces événements sont sous le contrôle de modifications post-traductionnelles, en particulier la **phosphorylation** des résidus sérine et thréonine (kinases GSK3β, CK1, CK2, PKA, PAK1, LATS2 et phosphatase SCP) ainsi que l'**ubiquitination** des lysines (E3 ligases β-TrCP, FBXL14 et MDM2 : leurs effets sont inhibés par les protéases USP et les oxydases LOXL). Les boucles de régulation «pro-EMT» sont représentées en vert et les boucles «anti-EMT» sont en rouge-rose ; le repliement du **SRD** (Serine Rich Domain : en jaune) induit par LOXL2 semble s'effectuer dans le cytoplasme, avant le transport nucléaire (représentation en pointillés). Il existe une étroite coopération entre l'inflammation, l'hypoxie et la signalisation des facteurs de croissance sous l'action coordonnée de NF-κB, Twist1 et GSK3β.

#### 4.1. Modèle de régulation par les kinases CK1 et GSK3β

Chez l'humain, le domaine SRD de la protéine SNAIL1 est composé d'une quarantaine de résidus, dont 15 sérines(S), 7 prolines (P) et 7 résidus acides (D et E), ce qui représente un environnement extrêmement favorable pour la reconnaissance par les kinases **GSK3β** et CK1. Comme pour la β-caténine et le facteur IκB, le domaine central abrite un motif de destruction DB de type DSGxxS (ou DSGxxxS dans certaines espèces) qui, lorsqu'il est activé par phosphorylation, est reconnu par le complexe ubiquitine-ligase **SCF/β-TrCP** en association avec le protéasome. (*cf. figure 31*) Dans les cellules épithéliales différenciées, la protéine GSK3β phosphoryle les résidus **S<sup>96</sup>** et **S<sup>100</sup>**, générant ainsi la séquence consensus DS<sup>P</sup>GxxS<sup>P</sup>, ce qui aboutit à la dégradation de SNAIL1 et donc à l'expression de la E-cadhérine.[510-511, 666] De façon intéressante, la régulation de l'activité de GSK3β et de son action répressive sur SNAIL1 sont sous la dépendance des mêmes éléments que dans le cas de la β-caténine et APC (*cf. figure 36*). En effet, la phosphorylation des **sérines S<sup>96</sup> et S<sup>100</sup>** est fortement amplifiée par la kinase **CK1** (priming), qui catalyse l'ajout de phosphates en positions +4 et +7 par rapport au dernier résidu du site consensus (**S<sup>104</sup>** et **S<sup>107</sup>**).[667] Ces deux derniers résidus sont conservés dans toutes les espèces étudiées à ce jour ; ils participent fortement à la stabilité de la protéine SNAIL1 ainsi qu'à son activité de répression de la E-cadhérine, aussi bien *in vitro* que dans les modèles d'invasion *in vivo*. [666-668] De même, au cours de l'EMT, la répression de GSK3β sous le contrôle de la voie Wnt et/ou de la signalisation PI3K/Akt, va permettre à la fois la translocation nucléaire de la β-caténine et la stabilisation de SNAIL1.[457, 666] (*cf. figure 31 + 35*)

Dans les cellules humaines, la phosphorylation du SRD par GSK3β est réversible par l'action de la **phosphatase SCP** (*Small C-terminal domain Phosphatase*) qui interagit avec le domaine C-terminal de SNAIL1 à l'intérieur du noyau, comme en témoignent les expériences de co-localisation. La surexpression de cette protéine dans la lignée épithéliale transformée MDA-MB231 est corrélée à une stabilisation de SNAIL1 et une augmentation du potentiel métastatique.[669] (*cf. figure 41*)

En dehors de la séquence DB, les prédictions virtuelles de sites consensus mettent en évidence 4 autres sérines susceptibles d'être phosphorylées par GSK3β (dont le résidu **S<sup>107</sup>** reconnu par CK1). Dans la protéine SNAIL1 humaine uniquement, ces acides aminés **S<sup>107</sup>**, **S<sup>111</sup>**, **S<sup>115</sup>** et **S<sup>119</sup>** ainsi modifiés constituent un motif S<sup>P</sup>xxxS<sup>P</sup>xxxS<sup>P</sup>xxxS<sup>P</sup> (ou S<sup>P</sup>xxxS<sup>P</sup>xxxS<sup>P</sup>) adjacent au NES.[511, 666] Dans les cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), les mutants constitutivement pseudo-activés pour ce site (mutants S/E) tendent à s'accumuler dans le cytosol ; la séquence ExxxExxxExxxE pourrait ainsi être favorable à une induction du NES et donc à l'export de SNAIL1 du noyau vers le cytosol par le transporteur **CRM-1/XPO-1 (exportine-1)**. [511] Les sérines **S<sup>107</sup>**, **S<sup>111</sup>** et **S<sup>115</sup>** sont conservées chez la souris et le rat mais sont absentes chez des vertébrés plus primitifs tels que *Xenopus Laevis*, *Danio Rerio* ou *Gallus Gallus*, suggérant une régulation indépendante du motif S<sup>P</sup>xxxS<sup>P</sup>xxxS<sup>P</sup> dans les cellules de ces organismes. Les événements moléculaires gouvernant la régulation du transport de SNAIL1 entre les différents compartiments cellulaires ne sont à ce jour pas encore totalement clarifiés ; au vu des données fournies par les expériences de mutagenèse dirigée, il est probable que la proximité entre les séquences NES et SRD conduise à des effets coopératifs entre les différentes modifications pos-traductionnelles de ces deux domaines.[511, 663-664, 669] (*cf. figure 41*)

Ainsi, il semble exister un lien direct entre la séquestration de SNAIL1 dans le cytoplasme et sa dégradation par le protéasome, en association avec les complexes ubiquitine-ligases.[511, 666-667] Dans le noyau, la déphosphorylation par **SCP** pourrait ainsi agir comme un signal de rétention nucléaire.[669] De même, de nombreuses études récentes mettent en évidence un lien entre la stabilité de SNAIL1 au niveau protéique et son induction transcriptionnelle via la régulation de son promoteur ; les protéines **GSK3 $\beta$** , **NF- $\kappa$ B** et **TWIST** ainsi que le complexe  **$\beta$ -caténine/E-cadhérine**, en association avec la **voie Wnt/TCF/LEF** et le **cytosquelette d'actine**, sont au cœur de ces mécanismes de **coordination**.[495, 510, 626, 670] (cf. figure 35)

Enfin, dans les modèles de développement *in vivo* chez *Danio Rerio*, l'**import** de SNAIL1 du cytoplasme vers le noyau est sous la dépendance du transporteur de Zinc **LIV1/SLC39A6** (*Solute Carrier family 39, member 6*). L'activité de cette protéine n'a pas été testée dans les cellules humaines mais l'expression de LIV1 dans les cellules tumorales métastatiques, de même que les homologies de séquences entre les espèces et l'absence de formation du mésoderme dans les embryons invalidés pour ce gène suggèrent une conservation de ce processus.[671-672] (cf. figure 41)

#### 4.2. Autres modifications post-traductionnelles

- **FBXL14** : dans plusieurs modèles cellulaires humains et murins, la E3 ubiquitine-ligase FBXL-14 (*F-Box and Leucine-rich repeat protein-14*) est capable de catalyser la poly-ubiquitination de SNAIL1 et médier sa dégradation, en l'absence de phosphorylation préalable par GSK3 $\beta$ . Cette enzyme semble interagir avec le domaine SNAG grâce à son motif F-box (motif conservé dans  $\beta$ -TrCP) ; dans le domaine central (résidus 120-151), les acides aminés modifiés par cette enzyme sont les mêmes que pour  $\beta$ -TrCP (lysines **K<sup>98</sup>**, **K<sup>137</sup>** et **K<sup>146</sup>** dans la séquence humaine), ce qui suggère une convergence des deux mécanismes de régulation. Dans les cellules en culture, FBXL14 est inhibée en réponse à l'hypoxie sous le contrôle de TWIST1 ; ces données amènent ainsi des éléments majeurs dans la compréhension des relations entre les mécanismes de régulation transcriptionnels et post-traductionnels de l'EMT.[536, 673] (cf. figure 41)

- **NF- $\kappa$ B** : la réaction de poly-ubiquitination assurée par  $\beta$ -TrCP est un phénomène réversible grâce à l'action des enzymes de la famille des ubiquitine-protéases USP (*Ubiquitin-Specific Protease*).[674] Au cours de l'EMT associée à une réaction inflammatoire (progression tumorale et fibroses), l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par le **TNF $\alpha$**  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) est responsable de la formation d'un complexe CSN par induction de la sous-unité **CSN2/COP9** (*Constitutive photomorphogenic Arabidopsis homolog, unit-2*). Le complexe CSN ainsi activé permet d'abolir la poly-ubiquitination par  $\beta$ -TrCP (et probablement FBXL14) et donc de stabiliser SNAIL1 au niveau protéique. Ce mécanisme pourrait être associé à un recrutement de la protéase **USP15**, comme c'est le cas pour la stabilisation de I $\kappa$ B. Des délétions par mutagenèse dans la séquence de NF- $\kappa$ B ont permis de démontrer que le domaine N-terminal RHD (*Rel-Homologue Domain*), permettant l'interaction avec I $\kappa$ B, est indispensable à cette régulation ; il en est de même pour le domaine C-terminal de liaison à l'ADN, ce qui laisse là encore entrevoir la possibilité d'une coordination entre les différents niveaux de régulation. Dans les cellules invasives MDA-MB231, l'altération à différents niveaux de cette voie d'activation de SNAIL est responsable d'une réduction de la formation des micrométastases dans les souris athymiques.[670, 675] (cf. figure 41)

- **LOXL2** : les Lysyl Oxidases (LOX) sont organisées autour d'un domaine catalytique conservé associé à un groupement cuivre  $\text{Cu}^{2+}$ , et dont le rôle est de permettre la désamination oxydative des lysines. Le résultat de cette modification est la formation d'un **groupe aldéhyde** au niveau de la chaîne latérale des **résidus lysine** concernés ; ces groupements sont hautement réactifs et tendent à former des liaisons covalentes entre deux résidus oxydés voisins. Dans les cellules MDCK, la protéine SNAIL1 est oxydée par LOXL2 au niveau des résidus **K<sup>98</sup>** et **K<sup>137</sup>** qui pourraient former un pont covalent, et ainsi induire un repliement du SRD, favorisant un rapprochement des domaines N et C-terminal. Cette modification post-traductionnelle s'effectue dans le cytosol (localisation cytoplasmique et péri-nucléaire de LOXL2) et semble favoriser la translocation nucléaire de SNAIL1 en s'opposant aux effets de GSK3 $\beta$  (masquage des sérines S<sup>96</sup> et S<sup>100</sup>) et à l'ubiquitination par  $\beta$ -TrCP et FBXL14 (lysines K<sup>98</sup> et K<sup>137</sup>). La protéine SNAIL1 mutée pour ces deux résidus (*K98R/K137R*) présente des défauts d'interaction avec le complexe Sin3A/HDAC1, résultant en une absence de répression du gène *CDH1* et un maintien du phénotype épithélial. Le mutant *K98R/K137R* est exprimé à des niveaux faibles lorsqu'il est transfecté ; à l'inverse, une surexpression de LOXL2 aboutit à une stabilisation de la forme sauvage (*WT* : *Wild Type*), la perte de la E-cadhérine et l'induction de changements morphologiques. De façon intéressante, LOXL2 interagit avec le domaine **SNAG** de SNAIL1 (résidus 1 à 7) mais agit sur des résidus lysine relativement éloignés ; la configuration repliée semble ainsi être à l'origine d'un rapprochement des résidus N-terminaux et des lysines K<sup>68</sup> et K<sup>137</sup>. [665, 676] (*cf. figure 41*)

- **PAK1** : les kinases de la famille PAK (*p21/Cdc42/Rac-Activated Kinase*) sont généralement considérées comme des protéines pro-oncogéniques capables d'intégrer les signaux intra et extracellulaires pour activer les voies de signalisation nécessaires à la survie des cellules transformées (RhoGTPases, MAPKines, NF- $\kappa$ B, ER- $\alpha$ ...). [677] Dans les cellules tumorales mammaires MCF7 et MDA-MB231, la phosphorylation activatrice du domaine **C-terminal** de SNAIL1 par PAK1 (**sérine S<sup>246</sup>**) est responsable de son accumulation nucléaire et d'une amplification de la répression du gène *CDH1*. [678] De façon intéressante, PAK1 peut également stimuler l'activité de plusieurs inducteurs majeurs de l'EMT, agissant potentiellement sur la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de SNAIL1. [677] Réciproquement, les molécules contrôlant la phosphorylation par PAK1 peuvent également être des cibles de SNAIL1 ; c'est le cas de la protéine **p21<sup>CIP/WAF</sup>** (ou CDKN1A) dont l'expression est régulée positivement par ce facteur de transcription. [535] Pour finir, l'activité de PAK1 est également sous le contrôle de mécanismes de phosphorylation (PI3K, GF-RTKs...) ; dans les cellules de carcinomes du colon de la lignée HCT116, PAK1 peut être induite par phosphorylation du résidu sérine S<sup>144</sup> et déphosphorylation de la thréonine T<sup>109</sup> ; ces modifications conduisent à la migration de ces cellules par perte de cohésion. Dans les cellules épithéliales différenciées, le résidu T<sup>109</sup> est normalement inactivé par la kinase **LKB1/PAR4** qui assure ainsi le maintien de la polarité apico-basale. [679] (*cf. figure 41*)

- **LATS2** : la sérine/thréonine-kinase LATS2 (*Large Tumor Suppressor, drosophila homolog 2*) joue un rôle déterminant dans les processus d'arrêt/progression du cycle cellulaire en relation avec les systèmes de contrôle de l'intégrité du matériel génétique.[680] Cette enzyme interagit directement avec **p53** pour moduler sa dégradation via la E3 ubiquitine ligase **MDM2** (*p53 binding protein homolog of transformed Mouse 3T3 cell Double Minute 2*). Une régulation positive de SNAIL1 par LATS2 a récemment été démontrée ; celle ci passe par une phosphorylation inhibitrice de l'activité MDM2, aboutissant à la stabilisation et l'accumulation nucléaire de SNAIL1. (Longmore, G.D. *et al.* ; données non publiées).

La forme active de la kinase LATS2 permet ainsi l'acquisition par les cellules épithéliales d'un phénotype invasif ; ce mécanisme pourrait également passer par une co-répression avec le facteur **AJUBA**. [681-682] De plus, au cours de l'EMT, ce système finement coordonné est renforcé par l'action inhibitrice de MDM2 sur la stabilité de la protéine **SLUG**. [660-661] (*cf. figure 41*)

- **PKA** : dans les cellules rénales appartenant aux lignées MDCK (chien) et HEK293T (humain), la kinase dépendante de l'AMPc est responsable de la phosphorylation du domaine N-terminal au niveau de la **sérine S<sup>11</sup>** (position +4 par rapport au domaine SNAG). La délétion de ce résidu par mutagenèse dirigée (S11A) est associée à une forte stabilisation de la protéine SNAIL1, comme pour les mutants des sites GSK3 $\beta$ . Ces expériences révèlent également que la présence de cette sérine en N-terminal est indispensable pour l'interaction avec Sin3A et la répression de la E-cadhérine.[668] Cet acide aminé est conservé chez les vertébrés et il est probable que sa position adjacente au domaine SNAG constitue un motif déterminant pour le recrutement des différents co-facteurs de SNAIL1. Il serait intéressant d'investiguer les effets de la pseudo-phosphorylation constitutive de ce résidu (mutation S11E), afin de déterminer si la liaison en position C-terminale de Sin3A est dépendante d'un signal de type S ou S<sup>P</sup>. En fait, vu le degré de conservation des acides aminés dans cette région et la complexité des systèmes de régulation, il est probable que la plupart des mutations (A, V, D ou E) puissent affecter les fonctions de répresseur de SNAIL. (*cf. figure 41*)

- **CK2** : de même que pour la PKA, le rôle d'activateur et/ou de répresseur de la protéine-kinase CK2 n'est à ce jour pas totalement clarifié. Cette enzyme phosphoryle la **sérine S<sup>92</sup>** dans un motif acide qui varie très peu entre les espèces. Toujours sur la base d'expériences de mutagenèse sur SNAIL1 (S92A), les fonctions cellulaires de ce résidu semblent impliquées dans la régulation de la stabilité protéique et la répression du gène *CDH1* par association avec Sin3A. La présence de cette sérine est également indispensable pour la phosphorylation d'un autre acide aminé présent au début du SRD : la sérine S<sup>82</sup>, dont le régulateur n'est actuellement pas encore identifié. De façon intéressante, la mutation S/A des résidus S<sup>11</sup> et S<sup>92</sup> n'a aucun effet sur la localisation cellulaire de la protéines SNAIL1 dans les modèles cellulaires étudiés.[668]

Dans ce contexte un peu «flou», le but de ma thèse a donc été d'étudier et de tenter de clarifier les aspects moléculaires de la régulation de SNAIL1 par la protéine-kinase CK2 (*dont les bases structurales et fonctionnelles sont décrites dans le chapitre V*) au cours de l'EMT, plus particulièrement dans les cellules épithéliales mammaires humaines de la lignée MCF10A (*Michigan Cancer Foundation, non transformed cell line-10A*). (*cf. partie résultats*)



# CHAPITRE V : La protéine-kinase CK2

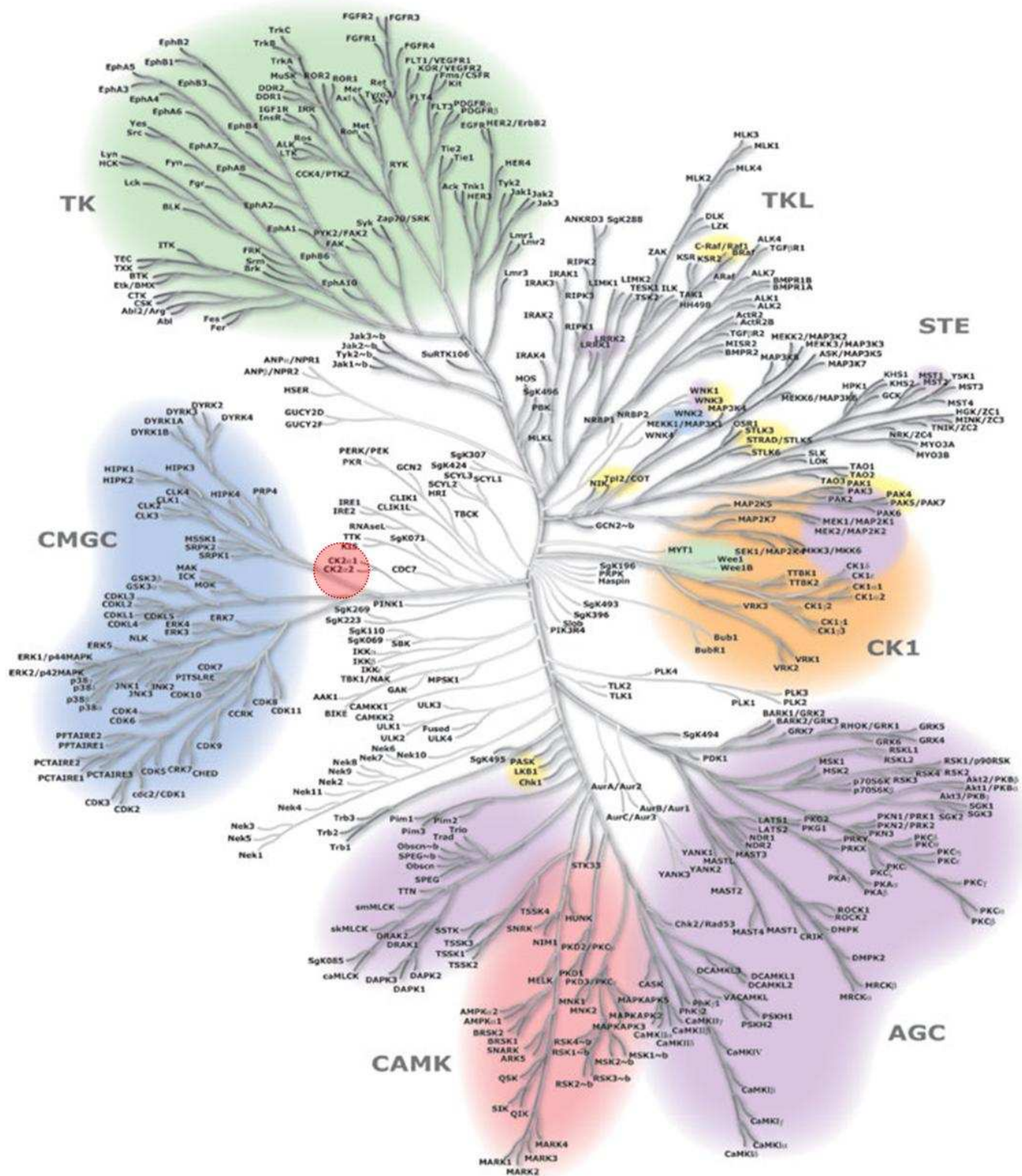
## A. Les protéine-kinases

Les diverses approches génétiques dans les modèles embryonnaires et cellulaires de nombreux animaux (y compris les mammifères) ont permis de décrypter quels étaient les facteurs extracellulaires (facteurs de croissance, cytokines) contrôlant l'activité transcriptionnelle liée aux différentes étapes de l'EMT (*cf chapitre IV*). Les voies de signalisation qui font intervenir des modifications post-traductionnelles des protéines impliquent en grande partie des mécanismes de phosphorylation assurés par les enzymes de la famille des protéine-kinases. Ces enzymes intègrent, amplifient et transmettent les signaux provenant de la membrane cellulaire, du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire vers leurs cibles intracellulaires, permettant ainsi l'exécution de programmes biologiques complexes. Elles agissent par activation ou inhibition de protéines cibles (substrats) qui pourront alors induire un changement dans l'expression génique (cas des facteurs de transcription), une réorganisation du cytosquelette (rho-GTPases, moteurs moléculaires, ...), ou encore la sécrétion de vésicules d'exocytose. La phosphorylation des protéines constitue un lien entre l'environnement extracellulaire et la réponse cellulaire et contrôle pratiquement tous les aspects de la vie cellulaire (cycles de division, différenciation, apoptose, polarité, migration / invasion, ...).[683-685]

### 1 - La superfamille des protéine-kinases

L'accroissement de la complexité des fonctions cellulaires au cours de l'évolution des eucaryotes s'est accompagné de l'apparition d'enzymes de phosphorylation pour presque toutes les molécules du vivant (glucides, lipides, protéines, ...). Nous nous intéresserons ici uniquement aux **protéine-kinases** capables de catalyser la phosphorylation de groupements hydroxyles dans les acides aminés. Selon la nature du groupe phosphorylé sur la protéine, ces enzymes sont classées en **sérine/thréonine kinases** et en **tyrosine kinases**.

L'étude du génome humain a conduit à l'identification de 518 gènes (soit 1,7 % du génome humain) codant pour des enzymes avec un site catalytique de type protéine-kinase (40 de ces gènes présentent toutefois des séquences codantes pour des domaines catalytiques atypiques). La famille des protéine-kinases inclue 385 sérine/thréonine kinases, 90 tyrosine kinases et 43 « tyrosine kinase-like » ; c'est le groupe enzymatique le plus diversifié après celui des protéases. On compte sept sous-groupes phylogénétiques majeurs comprenant les **TK** (Tyrosine-Kinases) ; les **TKL** (Tyrosine-Kinase-Like) ; les **STE** (homologues des Sterile Kinases 7, 11 et 20 de la levure) ; la famille **CK1** (homologues de la Casein Kinase 1) ; les **AGC** (protéines-kinases dépendantes de messagers secondaires : *PKA*, *PKG* et *PKC*), les **CAMK** (*Calcium/calmoduline-dependent protéine-kinases*) et enfin la famille **CMGC** (*CDK-MAPK-GSK3-CLK*). Certaines protéine-kinases atypiques n'intègrent aucun de ces groupes ; elles sont divisées en 13 familles de « protéine-kinases atypiques » dont les membres, pour la plupart, ne présentent pas (ou peu) d'homologie de séquence pour le domaine catalytique. [683, 686] (*cf. figure 42*)



**Figure 42 : Les sept familles du kinôme humain (dendrogramme).**  
D'après (*Cell Signaling Technology*) adapté de (Manning, G. et al. ; 2002) [686]

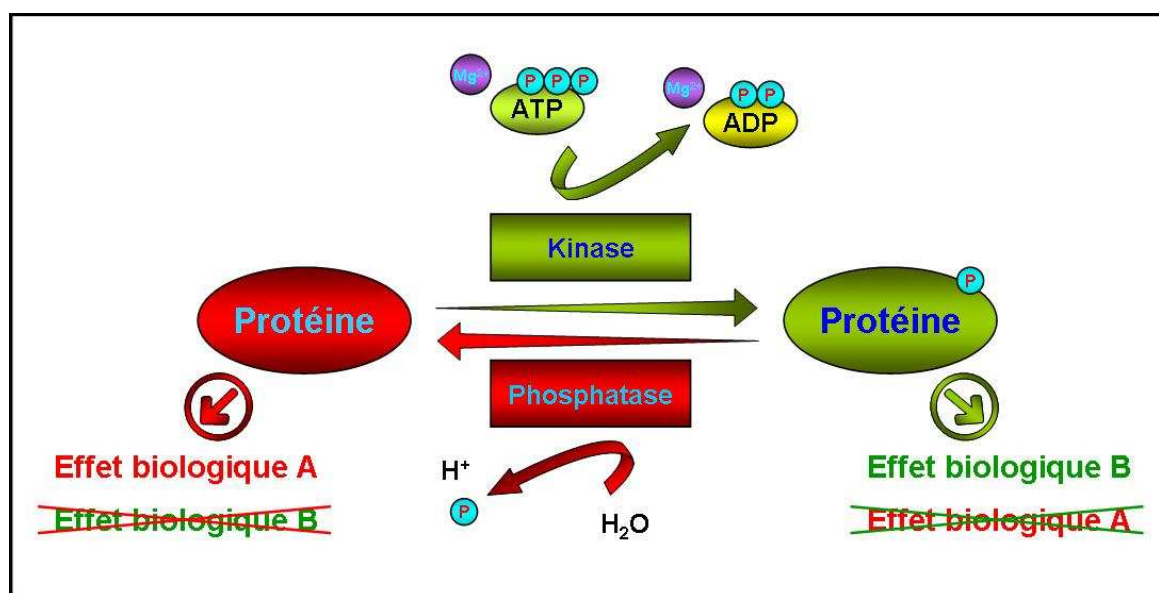
Une représentation de la superfamille des protéine-kinases humaines sous forme d'arbre phylogénétique permet d'illustrer les homologies de séquence entre les domaines catalytiques. Les sept groupes majeurs sont étiquetés et colorés distinctement (TK, TKL, STE, CK1, AGC, CAMK, CMGC). Les autres kinases, dites «atypiques» (dont font partie CK2α et α'), sont situées au centre de l'arbre, en gris. Elles sont elles-mêmes subdivisées en 13 sous-groupes dont certains membres ne présentent pas (ou peu) d'homologie de séquence avec les autres domaines kinase connus (non représentés). La plupart des protéine-kinases atypiques possèdent généralement un certain degré d'homologie structurale et fonctionnelle avec un ou plusieurs membres des familles classiques. Ainsi, CK2α et CK2α' (*CK2α1 et CK2α2 : cercle rouge*) sont des protéine-kinases atypiques apparentées aux membres du groupe CMGC (CDK-MAPK-GSK3-CLK).

## 2 - Catalyse de la phosphorylation des acides aminés

Au niveau biochimique, les protéine-kinases catalysent une réaction covalente qui consiste en un transfert du **phosphate en position  $\gamma$  de l'ATP** vers un groupement **hydroxyle** phospho-accepteur présent dans la chaîne latérale des résidus **Sérine, Thréonine et Tyrosine** (ou de façon plus marginale l'Histidine ou l'Acide aspartique).[683, 685]

**La réaction est la suivante :  $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP} + \text{R-OH} \Rightarrow \text{R-O-PO}_3^{2-} + \text{Mg}^{2+}/\text{ADP} + \text{H}^+$**

Historiquement découverte par *George Burnett* et *Eugene Kennedy* en 1954, cette modification post-traductionnelle est une des plus fréquentes et permet de moduler les propriétés physicochimiques des séquences protéiques.[687] La phosphorylation d'un substrat entraîne en effet des changements dans sa conformation, qui sont nécessaires à l'activation ou l'inhibition de fonctions spécifiques (activité catalytique, interactions avec d'autres partenaires, ...). C'est un phénomène dynamique et réversible grâce à l'activité catalytique constitutive et passive des enzymes de déphosphorylation : les **protéine-phosphatases** codées par au moins 150 gènes différents dans les cellules humaines. En effectuant au fur et à mesure la réaction opposée à celle catalysée par les protéine-kinases, les protéine-phosphatases ramènent les substrats à leur état basal, assurant ainsi une propagation des signaux sous la forme d'une « onde transitoire ». Cependant, leur rôle dans les cellules n'est pas limité à celui de terminateur de « signa » ; en effet de nombreuses protéines sont inactives à l'état phosphorylé et peuvent être activées ou stabilisées par déphosphorylation. Ainsi, les cycles de phosphorylation/déphosphorylation permettent d'obtenir une régulation sensible et rapide des voies de signalisation.[683, 685, 688-689] (cf. figure 43)



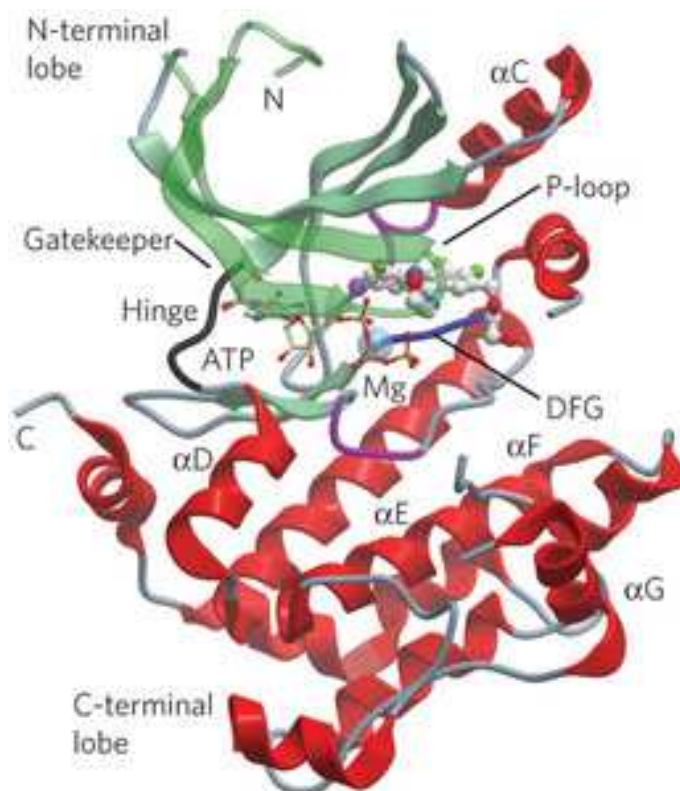
**Figure 43 : Phosphorylation par les protéine-kinases et réversibilité par les phosphatases.**  
D'après (Hunter, T. *et al.* ; 1992) [683]

Dans les cellules, il existe un équilibre entre la phosphorylation active assurée par les protéine-kinases et la déphosphorylation passive sous le contrôle des protéine-phosphatases. Bien que l'ajout d'un phosphate sur un substrat protéique corresponde souvent à une étape d'activation, cette modification post-traductionnelle peut exercer des fonctions diverses conduisant à des effets biologiques pléiotropiques (inhibition, stabilisation/dégradation, localisation subcellulaire, interactions, sécrétion...)

### 3 - Le domaine catalytique

Une étape majeure dans la compréhension moléculaire des protéine-kinases fût la résolution par radiocristallographie aux rayons X de la structure du domaine catalytique de la kinase **PKA** (Protein Kinase AMPc dependent).[690] L'organisation structurale du site catalytique des protéine-kinases est remarquablement conservée, notamment au niveau de la « **poche de fixation de l'ATP** » formée par la jonction des extrémités N-terminale et C-terminale sous la forme d'une poche bilobée (lobe supérieur N-terminal riche en feuillets- $\beta$  antiparallèles et lobe inférieur C-terminal constitué d'hélices- $\alpha$ ). Un autre élément majeur de la régulation de l'activité des protéine-kinases est le **segment d'activation** formé par la **boucle d'activation**, la **boucle P** et le **motif DFG** (Acide aspartique, Phénylalanine, Glycine).

La conformation de ces domaines est critique pour l'activité catalytique et détermine la sélectivité de reconnaissance des substrats. Elle peut être régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation par d'autres protéine-kinases, acétylation, ...) ou la fixation de petites molécules (cations, 5'-AMP, AMP cyclique, IP<sub>3</sub>, ...) agissant à proximité ou à distance du domaine kinase. En l'absence de signal, le site catalytique est occupé par la boucle d'activation alors que dans les formes actives des kinases, la poche catalytique adopte une conformation ouverte. Le segment d'activation est alors éloigné du centre catalytique et constitue un site de fixation des substrats protéiques.[691-692] (*cf. figure 44*)



**Figure 44 : Structure cristallographique du domaine catalytique de la kinase MEK1.**  
D'après (Fedorov, O. *et al.* ; 2010) [693]

Le domaine catalytique des protéine-kinases est organisé en deux domaines articulés par une charnière flexible (Hinge). Le lobe supérieur N-terminal est majoritairement composé de feuillets- $\beta$  antiparallèles (*vert*) alors que le lobe C-terminal inférieur s'organise autour d'hélices- $\alpha$  (*rouge* : C, D, E, F, G). L'activité fonctionnelle est régulée par le segment d'activation formé de la boucle d'activation (*gatekeeper*), la boucle P (*P-loop*) et le motif DFG. La poche de fixation de l'ATP peut être la cible d'inhibiteurs chimiques (*blanc*).



## **B. Structure des sous-unités de la protéine-kinase CK2**

CK2 est une sérine/thréonine-kinase atypique structurellement et fonctionnellement proche des membres de la famille CMGC (*cf. figure 42*) qui regroupe des enzymes généralement associées à la présence d'une sous-unité régulatrice (kinases dépendantes des cyclines, p38MAP kinases, kinases Erk, ...). C'est l'une des premières enzymes de cette classe à avoir été identifiée et sa découverte fut la première description d'une activité protéine-kinase. En effet, en 1954, Burnett et Kennedy rapportèrent pour la première fois un transfert de radioactivité de l'ATP (marqué par un phosphate radioactif  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ ) vers la caséine en présence d'extraits de foie de rat. Un fractionnement chromatographique révéla que cette phosphorylation était associée à deux pics d'activité enzymatique qu'ils nommèrent CK1 (*Casein-Kinase 1*) et CK2 (*Casein-Kinase 2*). [687] Depuis sa découverte, les fonctions de CK2 demeurent encore mal comprises et, malgré une large pléiotropie d'action de CK2 (plusieurs centaines de substrats identifiés *in vitro*), il est désormais établi que la caséine n'est pas un de ses substrats physiologiques. Ainsi, il fut décidé, en 1994 de renommer cette enzyme «*protein-kinase CK2*» et non plus «*Casein-Kinase 2*». On dénombre à ce jour trois sous-unités chez les vertébrés : CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  (sous-unités catalytiques) et CK2 $\beta$  (sous-unité régulatrice), toutes exprimées de façon ubiquitaire. [694-696]

### **1 - La sous-unité catalytique CK2 $\alpha$**

#### **1.1. Une structure bien définie...**

CK2 $\alpha$  est une protéine monomérique de 42 kD présentant une séquence primaire extrêmement conservée au cours de l'évolution. La première structure cristallographique obtenue pour cette kinase fût celle du maïs (*Zea mays*), elle présente de nombreuses similitudes avec toutes les autres isoformes purifiées dans les différentes cellules de mammifères (environ 30% d'homologie). [697-700] De façon atypique, CK2 $\alpha$  possède une activité constitutive liée au caractère rigide de son segment d'activation qui est maintenu en permanence en position ouverte par de nombreuses interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes avec le lobe N-terminal. De plus, cette enzyme a la capacité d'utiliser indifféremment l'ATP ou le GTP comme donneur de phosphate. [699, 701-702] Elle renferme également un «**gatekeeper**» (segment qui relie les lobes supérieur et inférieur de la poche catalytique) stériquement encombrant, ce qui bloque l'accès à la zone distale de la poche et réduisant la taille du site de fixation de l'ATP. [703] Enfin, toutes les isoformes séquencées de CK2 $\alpha$  possèdent un **motif DWG** à la place du motif conservé DFG (substitution de la phénylalanine par un tryptophane). Ce tryptophane en position 176 (W<sup>176</sup>) établit une liaison hydrogène avec le résidu leucine L<sup>173</sup> qui s'accompagne d'une stabilisation de la conformation active. [701]

#### **1.2. ... Mais une régulation pour le moins énigmatique**

Malgré la découverte de cette kinase il y a plus d'un demi-siècle, la régulation de CK2 $\alpha$  demeure mal comprise à la fois au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Cette enzyme est décrite comme constitutivement active et indépendante des messagers secondaires mais son activité est

inhibée *in vitro* par des peptides chargés négativement comme l'**héparine polysulfatée** ou les acides polyglutamiques.[704-705] A l'inverse, les petites molécules riches en charges positives telles que les polyamines sont responsables d'une élévation de l'activité catalytique de CK2 $\alpha$ . [698, 706] Ces observations conduisent à penser que le PIP<sub>2</sub> pourrait être un inhibiteur physiologiquement pertinent et ainsi constituer un mode de régulation pour cette kinase. On peut également noter que la séquence de CK2 $\alpha$  contient un **motif NLS** (*Nuclear Localization Signal*) masqué par la fixation de certains substrats qui favorisent ainsi sa la rétention cytoplasmique de l'enzyme.[701, 707] Ainsi, la «séquestration» de ce motif par diverses protéines pourrait constituer un mode de régulation intéressant de la kinase CK2, en particulier pour ses substrats nucléaires en relation avec le cycle cellulaire et/ou l'apoptose. De façon intéressante, CK2 peut être co-purifiée avec une molécule dont la nature reste inconnue. Une caractérisation biochimique a démontré que ce complexe présentait une activité réduite par rapport à l'enzyme seule ; différents tests ont pu démontrer que cette molécule n'était pas une phosphatase et que son action était réversible par l'ajout de certains **inositol-phosphates** (IP). Récemment, de nouvelles données sont apparues démontrant une potentielle régulation par IP<sub>4</sub> et IP<sub>6</sub>, deux molécules capables d'augmenter l'activité de la kinase native purifiée à partir du foie (cette modulation n'étant pas effective sur l'enzyme recombinante).[708-709] D'autre part, il a été décrit que l'activité de CK2 est significativement réduite par les phosphatidyl-inositol-phosphates dans les vésicules d'endocytose néoformées.[710]

### 1.3. Spécificité de reconnaissance des substrats

La capacité de phosphorylation de CK2 couvre un très large spectre de substrats (estimé à 20,9% du phosphoprotéome) caractérisés par une haute conservation d'un motif acide de type Ser/Thr-x-x-Glu/Asp/pSer (*SxxD*, *SxxE*, *SxxS<sup>P</sup>*, *YxxD*, *YxxE* ou *YxxS<sup>P</sup>*) particulièrement redondant dans les séquences de type SRD (*Serine Rich Domain*). [694, 711] Diverses données biochimiques ont démontré que les résidus du substrat n-2 à n+5 contribuaient à la reconnaissance de celui-ci par CK2 $\alpha$  (n=0 étant le résidu phosphorylé), avec une contribution majeure des résidus n+1 et n+3.[712-717] Comme la kinase GSK3 $\beta$  (famille CMGC), CK2 $\alpha$  possède une préférence pour les contextes acides ; ces enzymes peuvent coopérer lors de la multi-phosphorylation de séquences riches en sérine comme dans le cas de la régulation de la protéine APC (*couple CK1/GSK3 $\beta$  : cf. chapitre IV, figure 36*). [417, 713, 718-719] Dans ce contexte, un des exemples les mieux décrits dans la littérature est le cas de l'enzyme de synthèse du glycogène (GS ou GYS : *glycogen-synthase*), un régulateur majeur du métabolisme glucidique. Cette protéine est caractérisée par un domaine C-terminal riche en sérines dont la structure est similaire à celle du motif SRD présent dans la séquence de SNAIL1 (alternance de sérine et de proline avec présence de plusieurs lysines : *cf. chapitre IV et figure 40*). La régulation de ce domaine est sous la dépendance d'une phosphorylation séquentielle hiérarchique qui démarre par la reconnaissance successive des résidus S<sup>652</sup>, S<sup>648</sup> et S<sup>644</sup> par la kinase CK2 (dans cet ordre). Cette modification covalente favorise la fixation secondaire («priming») de la kinase GSK3 $\beta$  qui phosphoryle la glycogen-synthase au niveau des sérines S<sup>653</sup>, S<sup>649</sup>, S<sup>645</sup> and S<sup>641</sup> pour inhiber son activité et permettre l'élévation du taux de glucose sanguin.[417, 713-715, 720-723] De façon similaire, l'ajout d'un phosphate en position S<sup>370</sup> par CK2 sur la phosphatase PTEN facilite nettement la phosphorylation de la

thréonine T<sup>366</sup> par GSK3 $\beta$ . Dans ce cas, cette double phosphorylation est responsable de la déstabilisation de PTEN qui est alors orientée vers le protéasome par poly-ubiquitination.[717] Pour finir, CK2 coopère également avec GSK3 $\beta$  et CK1 pour phosphoryler le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine pour promouvoir son interaction avec la  $\beta$ -caténine et donc la stabilisation et le maintien de l'intégrité des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales différenciées.[719, 724-727] Une telle coordination est en grande partie due à la similarité des motifs consensus reconnus par ces trois kinases. En effet, CK1 et GSK3 $\beta$  possèdent également une affinité particulière pour les séquences acides et reconnaissent respectivement les motifs ExxS et SxxxE (E peut être remplacé par S<sup>P</sup>, T<sup>P</sup> ou D et S par T).

Ainsi, dans les cellules, le rôle de la protéine-kinase CK2 peut être vu comme celui d'un « initiateur de régulation » pour ses substrats en générant des motifs acides hautement réactifs, secondairement reconnus par d'autres protéines en relation étroite avec les systèmes de dégradation et de transport cellulaires. Une des caractéristiques singulières de la protéine-kinase CK2 est la présence d'une sous-unité régulatrice CK2 $\beta$  dont une des fonctions principales est la reconnaissance de motifs spécifiques afin d'orienter CK2 $\alpha$  vers ses substrats et favoriser la formation de ces contextes acides.

## 2 - Particularités de l'isoforme CK2 $\alpha'$

Une isoforme particulière, présente chez tous les eucaryotes, est la sous-unité CK2 $\alpha'$  codée par un gène distinct de celui de CK2 $\alpha$  (chez l'être humain, CK2 $\alpha'$  : gène *CSNK2A2*, locus 16q21 vs CK2 $\alpha$  : *CSNK2A1*, locus 20q13). Malgré une conservation totale du domaine catalytique, cette isoforme possède une séquence plus courte (37 kD) et un domaine C-terminal distinct. Ces différences sont probablement à l'origine de mécanismes de régulation spécifiques permettant d'orienter subtilement l'une ou l'autre des sous-unités catalytiques vers des substrats ou des partenaires d'interaction particuliers. Par exemple, au cours de la mitose, CK2 $\alpha$  est phosphorylée la kinase p34<sup>Cdc2</sup> au niveau des résidus T<sup>344</sup>, T<sup>360</sup>, S<sup>362</sup> et S<sup>370</sup> qui sont absents de la séquence de CK2 $\alpha'$ . [728-732] A ce jour, aucune différence majeure n'a pu être mise en évidence dans la structure ou la fonction enzymatique de ces deux protéines et elles sont capables de phosphoryler *in vitro* les mêmes types de substrats.[711, 733-739] De façon intéressante, quelques protéines interagissant avec CK2 $\alpha$  ne sont pas capables de lier CK2 $\alpha'$  ; c'est le cas notamment de CKIP-1 (*CK2 Interacting Protein-1*), HSP90 (*Heat Shock Protein-90kD*), PP2A (*sérine/thréonine Phosphatase 2A*) et PIN1 (*peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting protein-1*). [731]

Une étude comparative dans des tissus murins adultes a relevé des patterns d'expression semblables pour les différentes sous-unités CK2 avec une expression majoritaire dans le cerveau et les gonades masculines. Le niveau de CK2 $\alpha$  est toutefois relativement élevé dans la rate et le foie et les poumons, des organes dans lesquels CK2 $\alpha'$  est faiblement exprimé.[740] De plus, l'inactivation génique de ces deux protéines (séparément) a conduit à la mise en évidence de fonctions spécifiques non relégables. En effet, le KO de CK2 $\alpha$  est précocement létal au début de la deuxième moitié du développement embryonnaire (E12,5) dès suite de défauts dans l'organogénèse cardiaque et la formation du tube neural. A l'inverse, les souris mâles déficientes pour l'isoforme alpha prime sont parfaitement viables mais présentent une stérilité consécutive à



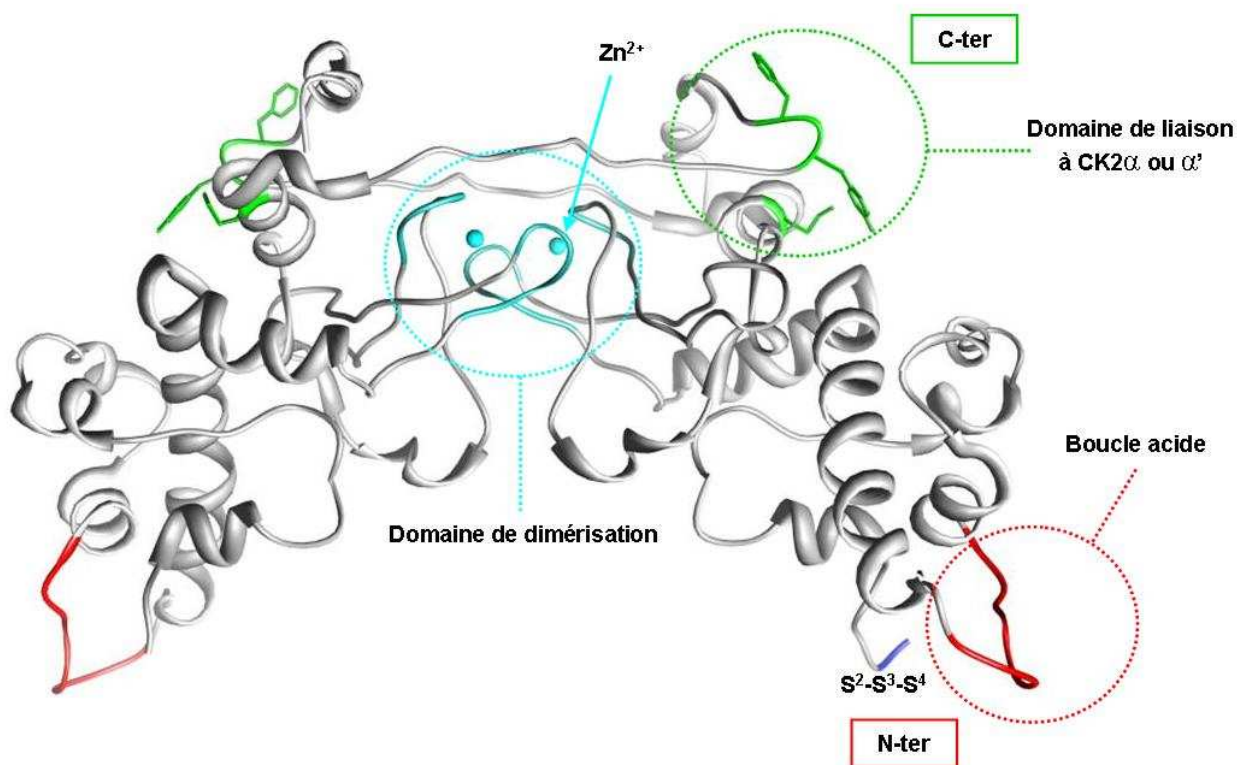
une absence de maturation des gamètes lors des derniers stades de la spermatogénèse.[741-743] Pour finir, des travaux récents utilisant le criblage d'une banque de siRNA spécifiques du kinôme humain dans les cellules épithéliales mammaires MCF10A ont permis de démontrer que CK2 $\alpha'$  était spécifiquement associée à des défauts de migration *in vitro*. [744]

Au niveau transcriptionnel, la régulation des promoteurs des gènes CSNK2A1 et CSNK2A2 est tout aussi mystérieuse. Leur séquence est dépourvue de motif «TATA box» mais l'exon-1 est bordé de domaines «GC-rich» et d'îlots CpG (CpG islands). En outre, on trouve des éléments de réponse pour les facteurs de transcription des familles SP (*GC-rich specific*), ETS-1 (ou ETV-1 : *E-Twenty-six, Variant 1*) et NF- $\kappa$ B ; ces protéines semblent participer à la régulation coordonnée des séquences promotrices des différentes sous-unités CK2 mais aucune donnée *in vivo* n'a encore été obtenue.[745-748]

### 3 - Structure de la sous-unité régulatrice CK2 $\beta$

La sous-unité CK2 $\beta$ , dénuée d'activité catalytique est une protéine adaptatrice de 29 kD présentant peu d'équivalents dans le protéome humain. Les seuls homologues connus de CK2 $\beta$  sont les cyclines ainsi que les sous-unités régulatrices associées à la phosphorylase kinase, la PKA, les CaM Kinases, la «DNA-dependent protein kinase», la «5'-AMP-activated protein-kinase» et la I $\kappa$ -B kinase IKK. Chez les mammifères, un seul gène CK2 $\beta$  a été identifié, il code pour une séquence de 215 acides aminés unique et hautement conservée dans l'évolution : 45 % d'homologie entre la levure *Saccharomyces cerevisiae* et l'humain ainsi qu'une identité totale entre les isoformes de *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* et *Homo sapiens*. [749] La structure cristallographique de CK2 $\beta$  a été résolue au laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse et révèle la formation d'un dimère de 2 x 27kD, très stable grâce une interaction homotypique entre deux motifs basiques en «doigt-de-zinc» présents dans la partie C-terminale.[750] Cette extrémité forme un domaine en relativement long qui tend à se détacher du corps de la protéine pour former une structure en «crochet» permettant un entrelacement antiparallèle de deux sous-unités régulatrices. CK2 $\beta$  possède également une boucle N-terminale acide (résidus D<sup>55</sup> et D<sup>64</sup>) exposée servant de site d'interaction avec certains partenaires protéiques (polyamines et eIF2).[704, 751-753] Cette répartition asymétrique des résidus basiques et acides aux extrémités de la protéine génère un potentiel électrostatique et une force de répulsion importante à l'origine de la forme atypique du dimère CK2 $\beta$ . (*cf. figure. 45*) Enfin, cette sous-unité possède un domaine d'interaction avec CK2 $\alpha$  ou CK2 $\alpha'$  (acides aminés 181 à 203) organisé sous la forme d'une interface réduite particulièrement hydrophobe. (*cf. figure 45 et partie C*)

Malgré une position génomique distante (gène *CSNK2B*, locus *6p21*), la régulation transcriptionnelle de CK2 $\beta$  semble s'exercer de manière coordonnée avec les celle des sous-unités catalytique ; son promoteur contient également des éléments de régulation pour les facteurs NF- $\kappa$ B, ETS-1 et SP.[746] Cette protéine est cependant ubiquitaire et son pattern d'expression dans la souris, comme pour CK2 $\alpha$  et CK2 $\alpha'$ , est caractérisé par une stabilisation particulièrement marquée dans les testicules et le cerveau.[740]



**Figure 45 : Structure cristallographique du dimère de sous-unités régulatrices CK2β.**

Fichier PDB (*Expasy tools*) ; d'après (Chantalat, L. *et al.* ; 1999) & (Niefind, K. *et al.* ; 2001) [699, 750]

Les zones d'interactions avec CK2α sont indiquées en vert, elles représentent une surface mince dans laquelle les cycles aromatiques hydrophobes jouent un rôle prépondérant. Les domaines en «doigt-de-zinc» (bleu-cyan) permettent une homodimérisation extrêmement stable des sous-unités CK2β. Enfin, les boucles acides (en rouge) sont localisées à proximité des sérines N-terminales phosphorylables (en bleu).

## C. Assemblage dynamique des sous-unités

### 1 - Assemblage hétérotétramérique

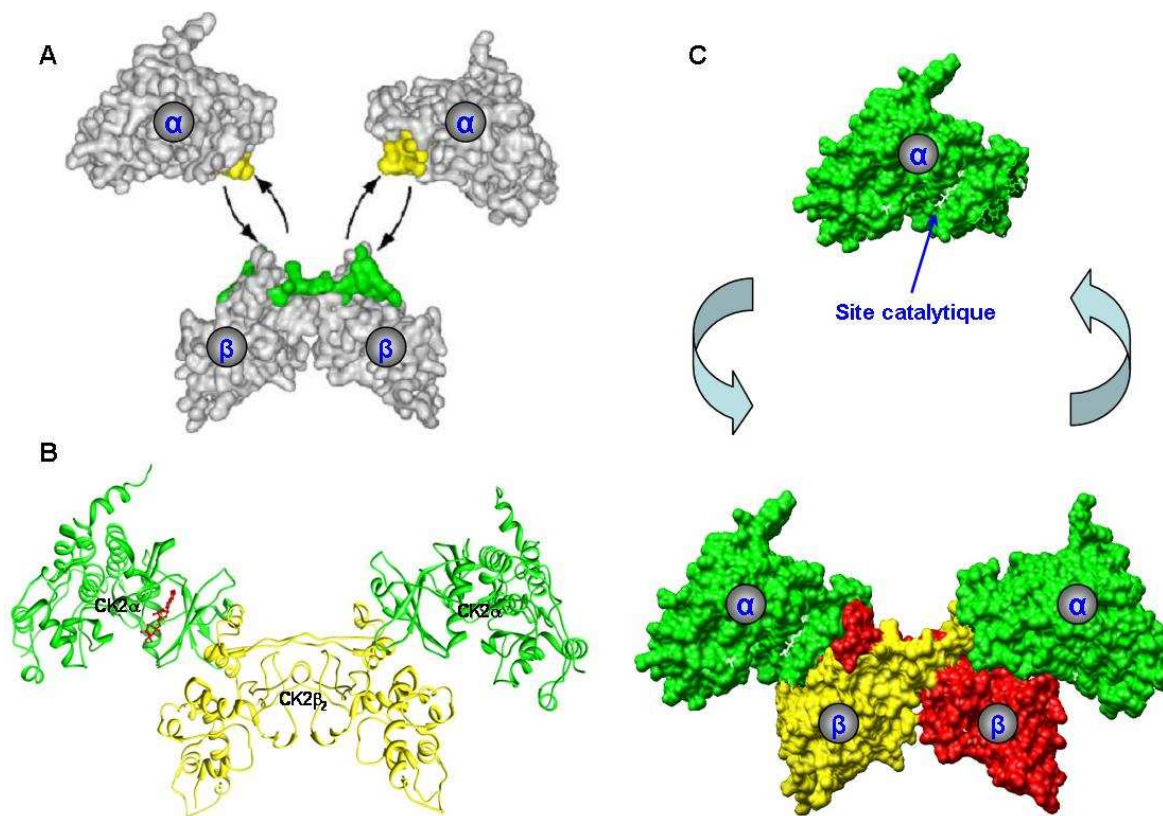
Une avancée majeure dans la connaissance de la régulation de CK2 fut la résolution de la structure de l'holoenzyme CK2α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> qui a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe hétérotétramérique composé d'un dimère CK2β<sub>2</sub> capable de lier de façon transitoire deux monomères α et/ou α'. Dans cette configuration, les deux sous-unités catalytiques ne sont pas en contact entre elles et la structure de l'holoenzyme CK2 est équilibre dynamique permanent entre une forme monomérique (α ou α') et tétramérique ( $\alpha + \alpha + \beta_2 \leftrightarrow \alpha_2\beta_2$  ;  $\alpha + \alpha' + \beta_2 \leftrightarrow \alpha\alpha'\beta_2$  ;  $\alpha' + \alpha' + \beta_2 \leftrightarrow \alpha'_2\beta_2$ ). [699, 735, 754-755] (*cf. Figure. 46*) Cet assemblage particulier est coordonné par une interface plane permettant un «accolement» des sous-unités catalytiques sur les résidus hydrophobes de CK2β (en particulier les résidus Y<sup>188</sup> et F<sup>190</sup>). [756]

Dans le cas de CK2α et α', la zone d'interaction avec CK2β forme une poche contenant une boucle flexible (boucle β4-β5) pouvant osciller entre des conformations ouverte ou fermée dans laquelle un encombrement stérique pourrait empêcher l'association avec CK2β. [757] Il a récemment été montré que

cette poche pouvait être maintenue en conformation inactive par la fixation de petites molécules organiques comme le glycérol, empêchant ainsi l'assemblage de l'holoenzyme.[734, 758-759]

Globalement, aucun changement conformationnel majeur n'est observé pendant la formation du tétramère à la différence de ceux décrits lors de la fixation des cyclines sur les CDKs ou lorsque la sous-unité régulatrice de la PKA se complexe à la sous-unité catalytique.[760] On note cependant quelques changements conformationnels au niveau de la boucle d'interaction avec CK2 $\beta$ .

Au niveau atomique, l'interface entre CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$ , est constituée de deux zones de contacts extrêmement réduites (832Å<sup>2</sup>) par rapport à la surface de l'holoenzyme, permettant une flexibilité dynamique des contacts. De plus, la constante de dissociation entre les deux sous-unités est extrêmement forte (5.4nM), il apparaît que la zone d'interaction a une surface réduite plutôt compatible avec un complexe transitoire. Ceci a ouvert la voie au développement d'inhibiteurs d'interaction entre les sous-unités.[756, 761] De façon inattendue, la structure cristallographique du tétramère a permis de démontrer que seule une des deux sous-unités CK2 $\alpha$  possède une molécule d'ATP dans le site catalytique ; ceci a conduit à l'hypothèse de la présence d'une fraction non négligeable de formes inactives de CK2 $\alpha$  dans les purifications tissulaires.[699, 702]



**Figure 46 : Structure tridimensionnelle de l'holoenzyme CK2 $\alpha_2\beta_2$ .**  
D'après (Niefind, K. *et al.* ; 2001) & (Filhol, O. *et al.* ; 2004) [699, 755]

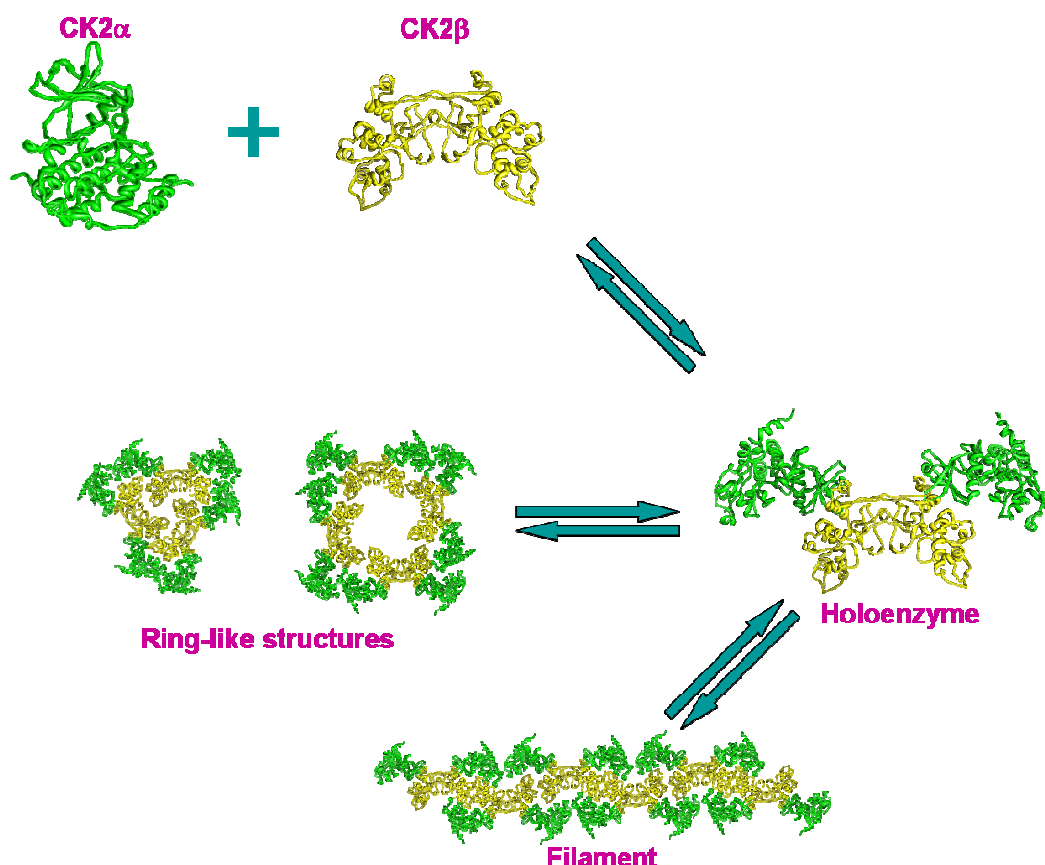
(A) L'interface entre les sous-unités catalytiques et régulatrices est constituée de deux zones de contacts (colorées en jaune sur CK2 $\alpha$  et en vert sur CK2 $\beta$ ) extrêmement réduites par rapport à la surface de l'holoenzyme (832Å<sup>2</sup>), ce qui suggère que le tétramère est un complexe transitoire *in vivo*.

(B) Positionnement des molécules d'ATP (en rouge) et organisation des hélices alpha et feuillets beta dans l'holoenzyme CK2 $\alpha_2\beta_2$  (dimère CK2 $\beta_2$  en jaune et monomères CK2 $\alpha$  en vert).

(C) Dans les cellules, cette flexibilité se traduit par un équilibre dynamique entre les formes monomérique et hétérotétramérique. Les sous-unités peuvent être également être recrutées indépendamment l'une de l'autre via un contrôle de la dynamique d'association/dissociation de l'holoenzyme.

## 2 - Macrocomplexes quaternaires

Dans les conditions de phosphorylation *in vitro* utilisant un mélange stœchiométrique des sous-unités CK2 $\alpha$  et CK2 $\beta$ , une «trans-phosphorylation» des sous-unités régulatrices est systématiquement observée dans le site consensus N-terminal SSSEE (ajout d'un phosphate sur les résidus S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup> et probablement S<sup>4</sup>). Cette modification post-traductionnelle est également observée dans les cellules en culture et pourrait être impliquée dans la dégradation de CK2 $\beta$  par le protéasome (destruction box).[728, 762] De façon surprenante, la sérine/thréonine-kinase CK2 $\alpha$  est également capable, en l'absence de CK2 $\beta$ , de s'«auto-phosphoryler» au niveau de la tyrosine Y<sup>182</sup> présent dans la boucle d'activation.[763] Diverses modélisations de ces données ont permis de démontrer que la structure hétérotétramérique de CK2 n'était pas suffisante pour expliquer la complexité de sa régulation. Ainsi, la formation de complexes supramoléculaires ayant pour unité de base l'holoenzyme pourrait être à l'origine de ces observations. *In vitro*, deux types de macrostructures peuvent être observées ; elles prennent la forme de filaments inactifs ou d'anneaux dont certains peuvent être «hyperactivés». [737, 764] (*cf. figure 47*) Dans ce sens, le cristal de l'holoenzyme a révélé la formation d'anneaux trimériques par des interactions ioniques impliquant les chaînes latérales de résidus présents à la fois dans la séquence de CK2 $\alpha$  (K<sup>74</sup>, K<sup>76</sup>, R<sup>80</sup>, R<sup>191</sup>, K<sup>198</sup>) et dans celle de CK2 $\beta$  (E<sup>61</sup>, D<sup>59</sup>, R<sup>195</sup>).[765-767]



**Figure 47 : Assemblages supramoléculaires de la protéine-kinase CK2 : (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>).**

D'après (Prudent, R. & Cochet, C. ; 2009) [737]

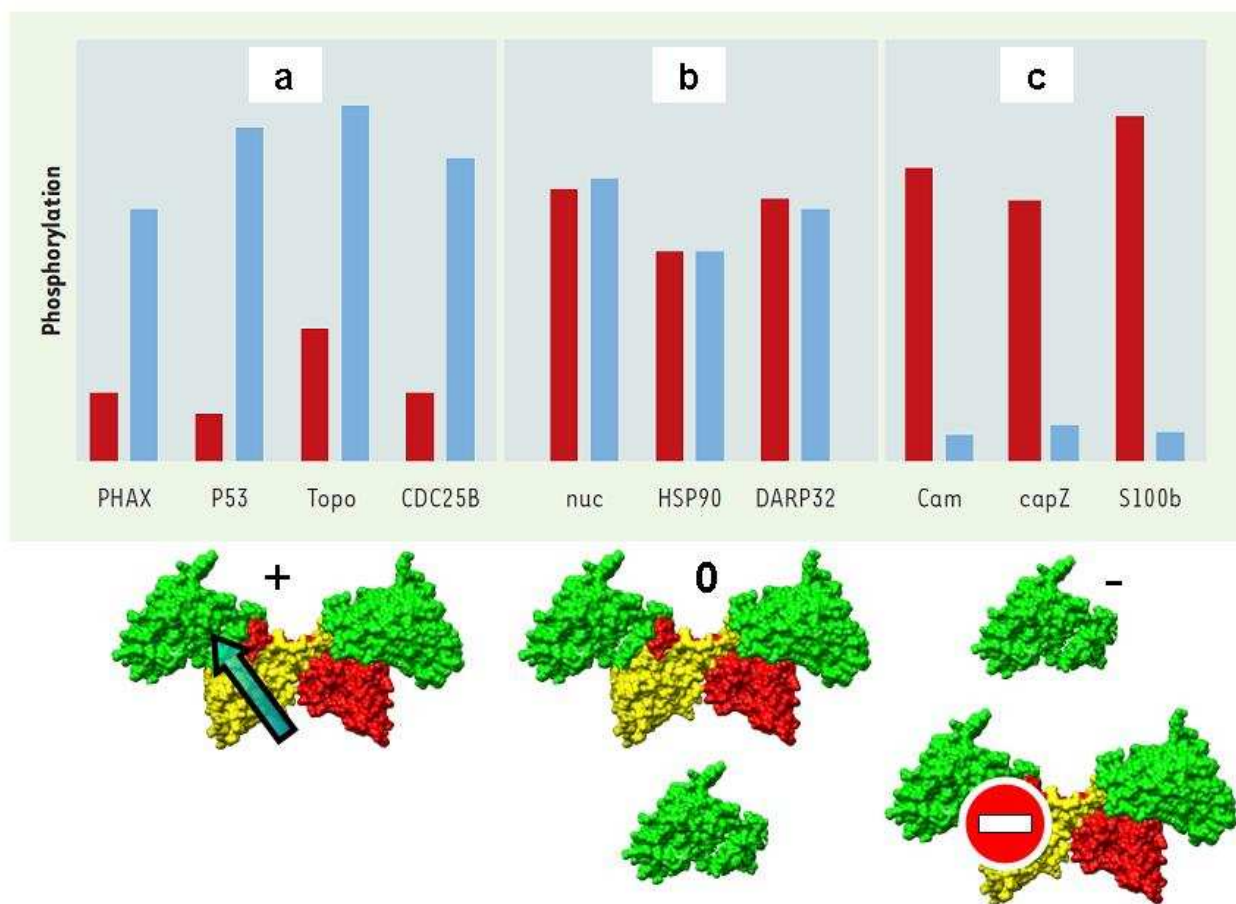
L'organisation supramoléculaire de CK2 pourrait constituer une forme de régulation de cette protéine-kinase. Les structures en anneaux («ring-like structures») sont composées de trois ou quatre tétramères α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> et semblent amplifier l'activité de phosphorylation *in vitro*. A l'inverse, les filaments (trimériques ou plus) sont au contraire décrits comme inactifs.

## D. Fonctions de la sous-unité régulatrice CK2 $\beta$

### 1 - Reconnaissance des substrats

L'association extrêmement dynamique entre les sous-unités qui composent l'holoenzyme CK2 conditionne fortement la reconnaissance de ses substrats. En effet, la sous unité CK2 $\beta$  agit comme une «plateforme de tri» permettant de réguler de façon positive ou négative l'accessibilité des molécules dans la poche catalytique. On peut ainsi définir trois catégories de substrats susceptibles d'être phosphorylés par CK2 :

- (a) les substrats  $\beta$ -dépendants «positifs» reconnus uniquement par le tétramère CK2 $\alpha_2\beta_2$ . [755, 768-771]
- (b) les substrats  $\beta$ -indépendants dont la phosphorylation n'est pas influencée par la présence de CK2 $\beta$ .
- (c) les substrats  $\beta$ -dépendants «négatifs» mieux phosphorylés par la forme monomérique CK2 $\alpha$  ; le dimère des sous-unités régulatrices inhibant dans ce cas l'accès à la poche catalytique (cf. figure 48)



**Figure 48 : Régulation de la reconnaissance des substrats par les sous-unités CK2 $\beta$ .**

D'après (Buchou, T. *et al.* ; 2003) [768]

Les histogrammes en rouge représentent la phosphorylation par  $\alpha_2\beta_2$  ; la réaction en la seule présence de CK2 $\alpha$  monomérique est affichée en bleu. Sur les centaines de substrats identifiés *in vitro* pour CK2, seul un faible pourcentage peut-être représenté sur ce schéma du fait du manque de données de la littérature.

## 2 - Localisation cellulaire du complexe hétérotétramérique

Malgré une affinité de l'ordre du nanomolaire *in vitro*, la surface d'interaction de 832 Å<sup>2</sup> entre CK2α et CK2β est typique de celle d'un complexe transitoire, les complexes permanents ayant des surfaces d'interaction moyenne de 1722 Å<sup>2</sup>. De plus, il a été démontré que les sous-unités pouvaient s'échanger de façon réversible au sein du complexe holoenzymatique.[756]

Dans des cultures cellulaires, on retrouve une fraction importante de CK2α associée à des composants cellulaires et non à CK2β et on observe une répartition cellulaire distincte de ces deux sous-unités dans plusieurs types cellulaires. [754, 772] Par exemple, seule CK2α est observée dans le réticulum endoplasmique rugueux, alors que les deux sous-unités sont retrouvées dans le réticulum endoplasmique lisse.[773] Il a également été mis en évidence que sous l'influence de signaux extracellulaires tels que le FGF-2, les sous-unités fusionnées à des protéines fluorescentes transitaient ensemble ou indépendamment (à des vitesses différentes) entre le cytoplasme et le noyau.[707, 774]

## 3 - Interstabilisation des sous-unités CK2

Les nombreuses homologies dans les promoteurs de CK2α, CK2α' et CK2β de même que les similitudes dans leurs patterns d'expression soutiennent fortement l'hypothèse d'une régulation coordonnée des différentes sous-unités. Cette idée est en partie soutenue par les observations de mécanismes de transphosphorylation au niveau du motif DB de CK2β.[728, 762] De plus, il a été observé que les sous-unités régulatrices sont synthétisées en excès par rapport à CK2α mais leur demi-vie en l'absence d'engagement dans l'holoenzyme est extrêmement courte (environ 10 minutes contre 18h pour la fraction engagée).

Dans ce sens, des mutations de CK2β au niveau de sa surface d'interaction avec CK2α (M<sup>166</sup>-Y<sup>188</sup>-F<sup>190</sup>) rendent difficiles son expression stable dans les cellules en culture, même en l'absence de protéine endogène.[756, 775] De façon intéressante, le pattern d'expression de CK2α et CK2α' est inversement proportionnel au cours de la maturation des spermatogonies et, lors des dernières étapes, on peut observer une inversion progressive du rapport entre ces deux sous-unités.[741-743]

## 4 - Fonctions indépendantes de CK2α

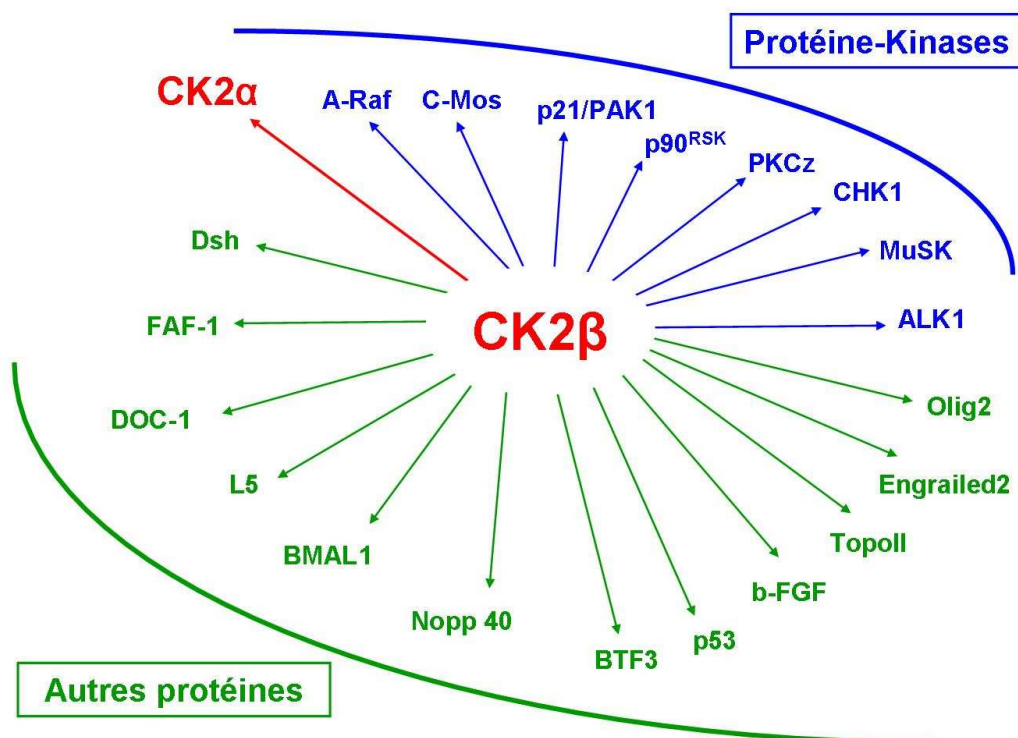
Chez la levure *S. cerevisiae*, l'invalidation des deux gènes *CK2B1* et *CK2B2* n'affecte pas (ou très peu) la prolifération des cellules en culture, ce qui suggère que l'activité constitutive de la sous-unité catalytique est suffisante pour la survie cellulaire.[749, 776-777] Dans le cas de *S. pombe*, l'invalidation du gène unique *CK2β* génère un phénotype non léthal caractérisé par une sensibilité au froid et des défauts de polarité cellulaire à l'origine de retards dans le cycle cellulaire.[778] Dans des espèces plus évoluées comme *Caenorabditis elegans* ou *Drosophila melanogaster*, le KO de CK2β est responsable de déficiences plus prononcées du fait de la complexification et de l'importance croissante des phénomènes de polarisation dans l'embryogenèse de ces organismes.[779-780] De même, chez l'embryon de Xénope, CK2 est indispensable à la polarisation dorsale et son absence a pour conséquence la disparition de l'axe dorso-ventral conduisant à



une mort extrêmement précoce.[781] Le KO de CK2 $\beta$  dans les modèles murins a permis de démontrer une létalité plus précoce des embryons par rapport à l'inactivation génique des sous-unités catalytiques (E6,5 contre E12,5 pour CK2 $\alpha$ ).[782-783] Si cette différence peut s'expliquer par des compensations entre les fonctions cellulaires de CK2 $\alpha$  et CK2 $\alpha'$  dans la plupart des organes, ces observations ont également conduit à supposer que CK2 $\beta$  pouvait agir indépendamment des sous-unités catalytiques.[750]

Ainsi, plusieurs partenaires de CK2 $\beta$  ont été identifiés et il a été démontré que l'interaction se faisait essentiellement via son extrémité C-terminale normalement engagée dans le tétramère. De ce fait, cette sous-unité se fixe sur d'autres protéine-kinases telles que A-Raf, c-Mos, CHK1/2, LYN, PKC, p90<sup>RSK</sup>, MuSK et p21/PAK1 ; elle peut éventuellement exercer une régulation (généralement négative) sur leur activité. Récemment, il a été mis en évidence que sous le contrôle de BMP7, CK2 $\beta$  s'associe au récepteur ALK1/TGF $\beta$ -RI pour amplifier la phosphorylation des facteurs Smads 1/5/8.[729, 784-792]

Enfin, de nombreux motifs d'interaction sont disséminés le long de la surface de CK2 $\beta$  ce qui lui permet de recruter différentes protéines qui agissent comme partenaires ou comme substrats de CK2 $\alpha$  ou d'autres kinases.[735, 793-794] (cf. figure 49)



**Figure 49 : Partenaires d'interaction de CK2 $\beta$ .**

D'après (Buchou, T. *et al.* ; 2003) & (Filhol, O. & Cochet, C. ; 2009) [735, 768]

Malgré la stabilité du tétramère  $\alpha_2\beta_2$  *in vitro*, il semble que, dans les cellules, les sous-unités régulatrices CK2 $\beta$  puissent s'en dissocier pour interagir avec d'autres kinases (en bleu) ou des partenaires protéiques (en vert). Dans un certain nombre de cas, la fixation de CK2 $\beta$  à ces molécules peut tout de même se faire par des domaines non engagés dans l'holoenzyme, ce qui permet de les orienter vers la poche catalytique et donc de moduler leur phosphorylation par CK2 $\alpha$  (en vert également).



## *Résultats*



## A. Contexte scientifique et Objectifs

Depuis sa découverte en 1968 par l'équipe du Dr Hay, l'EMT a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* qui ont conduit à l'identification de voies de signalisation impliquant des signaux extracellulaires transduits par des récepteurs et des molécules adaptatrices, elles-mêmes responsables de la régulation de divers facteurs de transcription. Les dernières années ont été déterminantes dans la mise en place de nouvelles théories et de modèles de classification qui ont permis de donner un sens plus concret à la plupart des observations effectuées jusqu'ici. Néanmoins, malgré les progrès impressionnants de la vidéo-microscopie et des techniques de marquage des protéines dans les modèles embryonnaires et les souris adultes, l'exploration des mécanismes fondamentaux de la régulation génique des composants des cellules épithéliales (jonctions cellulaires, cytosquelette, MEC...) ou l'expression de protéines permettant leur mobilité demeure un défi non résolu. Ainsi, l'utilisation des lignées cellulaires et des techniques de biochimie reste à l'heure actuelle le seul moyen de comprendre en détail ces phénomènes.

Depuis peu, les preuves s'accumulent pour étayer l'hypothèse d'une réactivation des programmes embryonnaires de l'EMT dans les cellules adultes tumorales motiles et potentiellement métastatiques. Le facteur de transcription SNAIL1, un régulateur majeur de l'expression de la E-cadhérine exprimé au cours du développement et dans les modèles de cellules métastatiques, est un des nombreux liens entre ces différents phénomènes. Sa régulation est extrêmement complexe et fait intervenir des systèmes coordonnés, en particulier des protéine-kinases, qui permettent d'établir une relation étroite entre les mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels. Au début de ma thèse, le laboratoire d'Amparo Cano a identifié deux nouvelles protéine-kinases potentiellement responsables de la régulation de SNAIL1 : PKA et CK2 $\alpha$ .

Au cours de mon doctorat, mon principal objectif a été de mieux comprendre la régulation de ce facteur de transcription par CK2 $\alpha_2\beta_2$  en utilisant un modèle de cellules épithéliales mammaires adultes non transformées : les cellules MCF10A (*Michigan Cancer Foundation, non transformed cell line 10A*)

Diverses études ont mis en évidence une surexpression de la sous-unité catalytique CK2 $\alpha$  dans des modèles d'oncogenèse et dans les biopsies de plusieurs tissus transformés mais il n'existe à ce jour aucun inhibiteur spécifique de cette enzyme capable de pénétrer dans les cellules. Depuis le succès des phases cliniques utilisant le Gleevec® (un inhibiteur de la kinase c-Abl) dans le traitement curatif des leucémies myéloïdes chroniques, plusieurs projets ont été initiés dans le but d'isoler de nouvelles molécules spécifiques de l'activité de cette enzyme. Dans une visée thérapeutique, le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse a lancé une campagne de criblage à haut débit de diverses chimiothèques afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de CK2 $\alpha$  ainsi que des inhibiteurs de l'assemblage hétérotétramérique de l'holenzyme CK2 $\alpha_2\beta_2$ .

Dans une optique plus fondamentale, des études récentes utilisant l'inactivation génique par KO des différentes sous-unités de CK2 (CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  et CK2 $\beta$ ) ont permis de démontrer que celles-ci possédaient un certain nombre de fonctions spécifiques non redondantes qu'il était difficile d'explorer par l'utilisation de molécules chimiques.

Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser une stratégie de type ARN interférence pour étudier séparément les effets des sous-unités catalytiques et régulatrices de CK2 dans les cellules MCF10A. Afin de palier aux inconvénients majeurs de l'utilisation des siRNA que sont leur passage à travers la membrane plasmique et leur dégradation continue à l'intérieur de la cellule, j'ai développé un système d'extinction stable basé sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux capables de reconnaître le génome cellulaire et d'y intégrer un shRNA encodant des précurseurs de siRNA de façon continue et stable.

L'utilisation de ce système se révèle particulièrement efficace dans les cellules MCF10A et conduit à une extinction protéique de l'ordre de 50 à 80%. De façon intéressante, ce niveau d'expression est beaucoup moins délétère pour la survie cellulaire que celui observé dans les cellules déplétées par recombinaison homologue (système Cre/Lox : extinction de l'ordre de 100%), ce qui suggère l'existence de classes de substrats avec des affinités différentes pour l'holoenzyme. Dans ce modèle, les cibles de CK2 impliquées dans la prolifération et/ou l'apoptose pourraient être régulées de façon «normale» avec des taux d'expression relativement faibles des différentes sous-unités. A l'inverse, la phosphorylation modulant l'activité de certains substrats pourrait nécessiter la présence de niveaux cellulaires plus élevés de CK2 ; ces phénomènes peuvent typiquement être observés dans la «fenêtre d'expression» offerte par notre modèle.

Ainsi, ce système nous a conduit à observer une activation transcriptionnelle et une stabilisation de la protéine SNAIL1 dans les MCF10A, en réponse à une dérégulation de l'équilibre (ou «balance») stœchiométrique des sous-unités CK2 qui existe normalement dans ces cellules épithéliales différenciées. Nous avons également pu démontrer que l'inhibition de CK2 $\beta$  est responsable de l'induction de changements phénotypiques similaires à ceux observés au cours de l'EMT : perte de la cohésion et de la polarité cellulaire, diminution de l'ancrage sur le support de culture et acquisition d'une morphologie fibroblastoïde («spindle shape»). Ces observations ont été confortées par une analyse détaillée de l'expression transcriptionnelle et protéique d'un certain nombre de molécules associées à l'EMT. Certes, tous les marqueurs décrits dans les chapitres I à IV n'ont pas été étudiés mais une étude transcriptomique a confirmé des variations dans l'expression de la plupart des cibles de SNAIL1, en particulier les constituants des jonctions adhérentes, serrées, desmosomales et hémi-desmosomales. Enfin, ce travail indique une potentielle coopération entre les sérine/thréonine-kinases CK2 et GSK3 $\beta$  dans la répression de SNAIL1 nécessaire au maintien de la cohésion dans les cellules épithéliales différenciées.

**Unbalanced expression of protein-kinase CK2 subunits induces  
Epithelial-Mesenchymal Transition associated with SNAIL1 upregulation**

**Alexandre Deshiere**<sup>1,2,3</sup>, Eve Duchemin-Pelletier<sup>1,2,3</sup>, Elodie Spreux<sup>1,2,3</sup>, Delphine Ciais<sup>1,2,3</sup>, Florence Combes<sup>4</sup>,  
Ivan Mikaelian<sup>5</sup>, Colette Charpin<sup>6,7</sup> Claude Cochet<sup>1,2,3</sup> and Odile Filhol<sup>1,2,3</sup>

**1** CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire Transduction du signal, 17 rue des Martyrs, Grenoble, F-38054, France.

**2** INSERM, U873, Grenoble F-38054, France.

**3** Université Joseph Fourier, Grenoble, F-38000, France.

**4** CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire Biologie, Informatique et Mathématiques, 17 rue des Martyrs, Grenoble, F-38054, France.

**5** CNRS UMR5201 – Génétique Moléculaire Signalisation et Cancer –Centre Léon-Bérard, Lyon F-69000, France.

**6** Department of Pathology, Hôpital Nord and Université de la Méditerranée, 13915 Marseille cedex 20, France.

**7** INSERM UMR 624, Université de la Méditerranée, Luminy, 13009 Marseille, France.

**Running title:** Unbalanced expression of Protein-kinase CK2 subunits induces Epithelial-Mesenchymal  
Transition associated with SNAIL1 upregulation

## **SUMMARY**

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is a process that drives a cohesive epithelial cell (or a group of cells) to strongly modify its organization and its protein composition, in order to gain migratory capacities. Such morphological changes have been observed during different embryogenesis steps and are known to be under control of a series of transcription factors, some of which are also expressed during tumor progression. The transcriptional repressor SNAIL1 appears to be a key element in these phenomena. In epithelial cells, its protein level is strikingly controlled by transcriptional events as well as posttranslational modifications, in particular phosphorylation mediated by serine/threonine-kinases. Protein-kinase CK2 is a multi-subunit enzyme regulating crosstalk among multiple signaling pathways involved in many physiological and pathological processes, including epithelial cell differentiation. CK2 was recently shown to phosphorylate SNAIL1 and to regulate both its repressor activity and its protein stabilization. Here, we demonstrate that CK2 $\alpha$  phosphorylation of SNAIL1 is mediated by CK2 $\beta$  regulatory subunit and that this modification is required for subsequent GSK3 $\beta$  phosphorylation. Moreover, we show that CK2 $\beta$  silencing in non-transformed MCF10A mammary epithelial cells triggers EMT-related morphological changes associated with SNAIL1 upregulation, E-cadherin repression and vimentin upregulation. Taken together, these data provide evidence that CK2 $\beta$  is critically required for SNAIL1 phosphorylation events that act to suppress EMT and maintain epithelial morphology.

## **INTRODUCTION**

Epithelial cells are key components for a plethora of vital functions in mammals, in particular because they can polarize and interact cohesively in a dynamic manner. These properties, grouped under the term of “Epithelial plasticity”, can manifest themselves in different ways of which the most complex is Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). This process regroups several mechanisms including cell dispersion in embryos, formation of fibroblasts in injured tissues and initiation of the invasive and metastatic behaviour in carcinoma (EMT type 1, 2 and 3, respectively). Interestingly, even they display some fundamental specificities, these three “types of EMT” also have several common features, in particular they are all defined by loss of epithelial cell morphology, dissociation of cell-cell contacts, remodelling of the actin cytoskeleton and acquisition of a mesenchymal cell shape in order to promote cell motility [1-5]. EMT programs involve a plethora of signaling pathways including those triggered by different members of the TGF $\beta$  superfamily, Wnt-ligands, Notch and various growth factors (reviewed in [1]). The vast majority of these key regulators converge towards the induction of several transcription factors that essentially act as repressors for epithelial genes [2]. In this context, SNAIL factors are the most widely studied effectors of EMT and are strongly involved in E-cadherin repression. Their regulation is highly complex and is characterized by an intimate link between protein level and transcriptional regulation. Previous studies have highlighted the role of different post-translational modifications in the regulation of SNAIL1 involving protein-kinases such as GSK3 $\beta$ , CK1, PAK1 and PKA (reviewed in [3]). Recently, protein-kinase CK2 was also identified as a new potent regulator of SNAIL1, controlling both its protein stabilization and its repressor activity in MDCK epithelial cells [4]. CK2 is a multi-subunit protein kinase composed of two catalytic subunits ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha'\alpha'$  or  $\alpha\alpha'$ ) and a dimer of regulatory  $\beta$  subunits [5-6]. In mice, CK2 $\beta$  is vital for ES cells survival and functional loss of this gene is lethal at Embryonic day E6.5 from massive apoptosis in gastrula, indicating that the protein is essential for cell viability during mesoderm formation. In the same study, a conditional knockout approach shows that lack of CK2 $\beta$  is deleterious for mouse ES cells and primary embryonic fibroblasts [7]. In adult cells, Live-fluorescence imaging studies provided evidence of independent and rapid movements of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  [8] and that this kinase was a moving enzyme rapidly recruited to target specific proteins in response to different stimuli [9]. Furthermore, despite the fact that CK2 catalytic subunits possess constitutive activity; CK2 $\beta$  regulatory subunit is a central component of the tetrameric CK2 complex, controlling CK2 $\alpha$  substrate specificity and enzymatic activity, operating as a docking platform affecting the accessibility to the catalytic site of binding substrates [10-14].

For example, several transcription factors such as Engrailed 2 or Olig2, as well as the eukaryotic translation initiation factor 2 $\beta$  (eIF2 $\beta$ ) are phosphorylated by CK2 in a CK2 $\beta$ -dependent [15-17]. In contrast, other CK2 substrates such as HDACs, CFTR channel, are targeted by the CK2 catalytic subunit in the absence of CK2 $\beta$  [18-19].



In epithelial cells, both CK2 $\alpha$  and  $\beta$  plays a central role in the control of several physiological and pathological processes involving modulation of both cell cycle and apoptosis. Additionally, increasing evidence indicate that CK2 may also be involved in the maintenance of epithelial cell morphology and polarity, nevertheless its exact role still remains unclear [20-21]. For example, phosphorylation of  $\alpha$ -catenin by CK2 $\alpha$  leads to the disruption of  $\alpha$ -catenin/ $\beta$ -catenin complex and loss of intercellular adhesion [22-23]. Although the role of CK2 in the Wnt signaling pathway has not been fully defined, it is known that forced expression of Wnt-1 in breast epithelia causes  $\beta$ -catenin nuclear accumulation through direct phosphorylation by CK2 on threonine T<sup>393</sup>. This post-translational modification leads to proteasome resistance, increased protein level and enhanced co-transcriptional activity [24]. *In vivo* activation of these pathways can be noticed during conditional transgenic expression of CK2 $\alpha$  in mouse mammary gland and is associated with formation of squamous metaplasia and occurrence of adenocarcinoma. Conversely, CK2 cooperates with GSK3 $\beta$  and CK1 to phosphorylate E-cadherin cytoplasmic domain in order to promote its interaction with  $\beta$ -catenin and stabilization of adherens junctions integrity [25-29]. To date, CK2 can affect several distinct and “apparently opposite” processes in epithelial cells, very little is known about the coordination events that regulate this kinase both in normal and transformed cells.

In the present work we provide evidence that CK2 $\beta$  regulatory subunit is required for CK2-mediated SNAIL1 phosphorylation and that this CK2 $\beta$ -dependent phosphorylation had a cumulative effect on GSK3 $\beta$ -mediated SNAIL1 phosphorylation. We also demonstrate that CK2 $\beta$  silencing in MCF10A cells ( $\Delta$ CK2 $\beta$  MCF10A) did not cause apoptosis but instead triggered upregulation of both SNAIL1 mRNA and protein. Furthermore, CK2 $\beta$  inhibition was associated with cytoskeleton reorganization, expression of EMT-related features, and acquisition of migratory and invasion properties. Moreover, silencing of SNAIL1 in this setting suppressed the E-cadherin down-regulation induced by CK2 $\beta$  knockdown and prevented loss of epithelial characteristics. Collectively, these findings delineate a role for CK2 in the regulation of EMT programs and the maintenance of epithelial morphology by preventing SNAIL1 transcriptional activation and protein stabilization.

## **RESULTS**

### **CK2 $\alpha_2\beta_2$ holoenzyme phosphorylates SNAIL1 and cooperates with GSK3 $\beta$ .**

In cohesive epithelial cells, SNAIL1 transcription is tightly controlled in order to maintain E-cadherin expression. Moreover, SNAIL1 is highly regulated by post-translational modifications that control both its localisation and stability in the cell [3, 30-32]. SNAIL1 is known to be phosphorylated by several protein-kinases and it has been recently reported that SNAIL1 is phosphorylated by CK2 on residue S<sup>92</sup> [4]. Consistent with the critical role of CK2 $\beta$  in the targeting of CK2 substrates, we reasoned that SNAIL1 phosphorylation by CK2 could be potentially modulated by its regulatory subunit. To test this possibility, MBP-SNAIL1 was incubated in a kinase buffer either with CK2 $\alpha$  or CK2 $\alpha'$  in the absence or presence of CK2 $\beta$ . Figure 1A shows that SNAIL1 phosphorylation by CK2 *in vitro* was strongly enhanced when CK2 $\beta$  was added to the reaction. Importantly, optimal SNAIL1 phosphorylation was obtained in the presence of stoichiometric amounts of CK2 catalytic and regulatory subunits (Figure 1B), indicating that SNAIL1 is preferentially targeted by the CK2 holoenzyme CK2  $\alpha_2\beta_2$ . Mass spectrometry analysis confirmed that SNAIL1 was efficiently phosphorylated on S<sup>92</sup> by the CK2 holoenzyme and that this covalent modification is a CK2 $\beta$ -driven process. It is well established that SNAIL1 proteasomal degradation is in part mediated by GSK3 $\beta$ -dependent phosphorylation [30-32]. Additionally, the efficiency of substrate phosphorylation of most GSK3 $\beta$  substrates, including SNAIL1, is shown to be greatly increased by priming phosphorylation events [33-36]. Given the importance of CK1 priming for efficient phosphorylation of SNAIL1 by GSK3 $\beta$ , we assessed the hypothesis that CK2 could also participate in this process. To directly test this possibility, MBP-SNAIL1 recombinant protein was pre-treated with or without CK2 in the presence of unlabeled ATP. Then, to rule out that CK2 may function as an allosteric activator of GSK3 $\beta$ , CK2 was inactivated using heparin and samples were then incubated in the presence or absence of GSK3 $\beta$  along with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP/MgCl<sub>2</sub>. As shown in Figure 1C, MBP-SNAIL1 was weakly phosphorylated by GSK3 $\beta$  alone (lane 1, 2 and 3). Conversely, MBP-SNAIL1 previously “primed” by CK2 holoenzyme was several fold more phosphorylated by GSK3 $\beta$  (lane 5), indicating that CK2 holoenzyme is required for efficient SNAIL1 phosphorylation by GSK3 $\beta$  and that a synergistic hierarchical phosphorylation can set up between these two kinases.

## **Inhibition of CK2 $\beta$ expression in MCF10A cells triggers SNAIL1 induction at both mRNA and protein levels.**

To explore the role of CK2 in SNAIL1 phosphorylation *in vivo*, we used MCF10A immortalized epithelial cells, isolated from mammary glands and classified as basal cell types [37]. In this model, both CK2 $\alpha$  and  $\alpha'$  catalytic subunits, together with CK2 $\beta$  regulatory subunits, are expressed in early passage parental MCF10A cells (Figure 2A) and contribute to overall CK2 activity (Figure 2B). Consistent with this observation, we used lentiviral delivery to generate stable CK2 $\beta$  knockdown cells stably expressing a specific shRNA against human endogenous sequence ( $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells). To rule out off-target effects that can be caused by shRNA, we engineered a double transduction system to generate control cells expressing both the CK2 $\beta$  specific shRNA and the exogenous chicken-CK2 $\beta$ -HA tagged protein, insensitive to the human-targeting sequence ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$  cells; figure SD-1A). [17]. Several mass cell cultures were obtained from multiple transduction experiments to avoid any clonal selection bias (see Material and Methods) and CK2 subunits expression was evaluated at the mRNA and protein level compared to Mock-MCF10A cells expressing a no-target lentiviral shRNA. Western blot analysis revealed that CK2 $\beta$  as well as CK2 $\alpha'$  expressions were strongly reduced in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells, whereas the level of CK2 $\alpha$  was unchanged (Figure 2A). Interestingly, RT-qPCR analysis indicates that CK2 $\beta$  expression did not change the levels of either CK2 $\alpha'$  or CK2 $\alpha$  mRNA (Supplemental Figure SD-1A to C). CK2 kinase activity assayed in MCF10A cell extracts, using the canonical peptide substrate was not affected in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells (Figure 2B), while the CK2 $\beta$ -dependent phosphorylation of the eIF2 $\beta$ -derived peptide was strongly inhibited (Figure 2C). These results demonstrate that expression of CK2 $\beta$  in MCF10A cell extracts is required for CK2-mediated phosphorylation of the eIF2 $\beta$ -derived peptide. In consequence, the phosphorylation of CK2 $\beta$ -dependent substrates such as eIF2 can be specifically inhibited by unbalancing CK2 expression under control of shRNA delivery.

Previous biochemical studies have revealed that, to be efficiently phosphorylated by CK2, several CK2 substrates including transcription factors, need to interact physically with its CK2 $\beta$  regulatory subunit [11]. Therefore, we investigated a potential SNAIL1/CK2 interaction performing pull-down assays using MBP-SNAIL1 protein and MCF10A cell lysates. Endogenous CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  subunits co-precipitated with MBP-SNAIL1 in WT-, Mock- and  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ -MCF10A cell extracts. In contrast, we did not detect any association between MBP-SNAIL1 and CK2 $\alpha$  in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cell extracts (Figure 2D). Altogether, these data indicate that SNAIL1 binds CK2 holoenzyme through its CK2 $\beta$  subunit, reinforcing the key role of CK2 $\beta$  in SNAIL1 regulation.

SNAIL1 phosphorylation was further characterized, using different MCF10A cell extracts incubated with MBP-SNAIL1 as substrate for phosphorylation, using radio-labeled  $\gamma$ 32P-ATP. Figure 2E discloses that SNAIL1  $\gamma$ 32P labelling, alike the eIF2 $\beta$ -derived peptide (Figure 2C), was significantly decreased in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A lysates, compared to all the other cell extracts. This observation indicates that a disturbed formation of the CK2 holoenzyme, in response to CK2 $\beta$  silencing, had a significant impact on optimal SNAIL1 phosphorylation in MCF10A cell extracts.

In view of the fundamental contribution of phosphorylation in stabilizing SNAIL1 protein level, we next examined the expression of this factor by western blot analysis. The band corresponding to SNAIL1 protein was clearly detected in TGF $\beta$ 1-treated cell extract, as well as in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -cell lysates (Figure 3A: compare to WT and  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$  conditions). Furthermore, we could notice that SNAIL1 electrophoresis migration was slightly different in TGF $\beta$ 1- and  $\Delta$ CK2 $\beta$ -cell lysates, suggesting differential post-translational modifications carried on this protein.

During EMT, SNAIL1 regulation is highly complex and involves a close relationship between protein level and transcriptional regulation, as shown by previous *in vitro* and *in vivo* analysis of GSK3 $\beta$  inhibition in MCF10A cells [3, 32]. To evaluate the participation of protein-kinase CK2 in the control of SNAIL promoter activity, we next examined SNAIL1 transcription by quantitative RT-PCR and gene reporter activity in our different MCF10A cell lines (Figure 3B and 3C, respectively). SNAIL1 mRNA expression was markedly induced in both  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A and in TGF $\beta$ 1-treated cells (>15-fold induction), compared to WT- or  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ -MCF10A cells. To investigate promoter activity, the different previously described MCF10A cell lines were transiently co-transfected with pSNAIL1-luc as a reporter [38] with TK-renilla (RL-TK internal standard, Promega). The results shown in Figure 3C indicate that SNAIL1 promoter activity was strongly induced in both TGF $\beta$ 1- and  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells. Collectively, these findings indicate that CK2, likewise GSK3 $\beta$ , acts as a repressor for SNAIL1 expression in MCF10A cells both at the transcriptional and posttranslational levels, substantiating our hypothesis that these two serine/threonine-kinases can act cooperatively to maintain low levels of SNAIL1 protein in differentiated epithelial cells.

### **CK2 subunits silencing induces EMT-like morphological changes.**

Based on the fact that SNAIL1 main role is to bind E-boxes containing promoters in order to regulate the expression of EMT-related genes [39], we then focused our attention on transcriptional programs affected by CK2 $\beta$  inhibition. When grown in two-dimensional culture,  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells exhibited an elongated mesenchymal-like morphology with decreased cell-cell contacts. Conversely, Mock- and  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ -MCF10A cells retained a tightly packed cuboidal epithelial-like morphology similar to parental WT-MCF10A cells (Figure 4A). Moreover, WT- and  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ - cells harbored cortical F-actin staining (panels a and c) whereas large stress fibres could be seen in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -cells, as well as in TGF $\beta$ 1-treated cells (panels b and d). Because the distinct morphology noticed in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -cells was reminiscent of cells having undergone EMT, we next analyzed the expression of epithelial and mesenchymal markers upon CK2 $\beta$  shRNA delivery compared to cells treated with TGF $\beta$ 1, a known inducer of EMT in mammary epithelial cells.[40-41] In this way, we used confocal immunofluorescence and western blot analysis to directly test the expression of vimentin, E-cadherin and N-cadherin in stable knockdown MCF10A cells. As visualized in Figure 4B, E-cadherin expression was strongly blunted in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells as well as in TGF $\beta$ 1-treated cells (panels f and h), compared to WT, Mock or  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ -cells (panels e and g). As expected, a mirror image was obtained for N-cadherin expression (panels i, j, k, l). Changes in these two EMT markers expression were subsequently confirmed by immunoblot detection. Additionally, vimentin was highly expressed whereas cytokeratins level was found to be downregulated in both  $\Delta$ CK2 $\beta$ -cells and TGF $\beta$ 1-treated cells (Figure 4C : compare with Mock and WT cells). The regulation of E-cadherin or vimentin promoters was further assessed using specific reporter constructions transcriptionally fused to the firefly-luciferase gene. In  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells, alike following TGF $\beta$ 1-treatment, the E-cadherin promoter was repressed (Figure 4D), albeit vimentin-reporter expression was markedly enhanced, in comparison with WT-,  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ - and Mock-cells (Figure 4E). Importantly, CK2 $\alpha\alpha'$ -siRNA and CK2 $\beta$ -siRNA treated MCF10A cells exhibited a similar mesenchymal-like phenotype associated with SNAIL1 upregulation and E-cadherin repression. (Supplemental Figure SD-2A to H). The fact that inhibition of either CK2 catalytic or regulatory subunits is sufficient to induce EMT early steps indicates that full holoenzyme activity might be required to retain epithelial cohesive morphology in MCF10A cells.

We next sought to determine whether the loss of apico-basal polarity observed in MCF10A cells could be extended into other types of epithelial cells. To further explore this possibility, effects of CK2 $\beta$  knockdown were evaluated in human HaCaT keratinocytes, that are also known to undergo EMT in response to TGF $\beta$ 1 [42]. In agreement with previous experiments, a characteristic E/N-cadherin switch could be observable in either  $\Delta$ CK2 $\beta$ -HaCaT cells TGF $\beta$ 1-treated HaCaT cells. Again, the expression of a no-target random shRNA had no effect on epithelial morphology when grown in two-dimensional culture (Supplemental Figure SD-3: compare with  $\Delta$ CK2 $\beta$ - or TGF $\beta$ 1-conditions with Mock and WT cells). Altogether, these data support a key role of CK2 $\beta$ -dependent CK2 activity in the maintenance of cohesiveness in different types of human epithelial cells.

## Comparative transcriptomic analysis of $\Delta$ CK2 $\beta$ - and TGF $\beta$ <sub>1</sub>-induced EMTs.

Since large gene expression remodelling represents a determinant step for epithelial cells to acquire a pro-migratory behaviour, the identification of molecular events that are associated with this biological process strongly requires high throughput analysis at least at the RNA level [43-44]. To date, a very few direct effectors of CK2 have been identified with respect to induction of EMT and invasive migration in epithelial cells. To explore in detail the expression profiles of known EMT and SNAIL1-related genes retrieved from literature, we undertook a comparative genome-wide characterisation of CK2 $\beta$ - and TGF $\beta$ <sub>1</sub>-regulated mRNA expression. We proceeded by deriving individual gene expression signatures of Mock-, TGF $\beta$ -treated or  $\Delta$ CK2 $\beta$  MCF10A cells, obtained from pooled twice-performed human pangenomic DNA microarray experiment. Genes regulated in the different experimental conditions were bioinformatically extracted using significant thresholds (at least 1,5-fold) for differential-representation of any known regulated genes. We observed that EMTs triggered by TGF $\beta$ <sub>1</sub> or CK2 $\beta$ -depletion induced a weak overlapping set of changes in gene expression. Among ~25,000 unique genes tested, we found ~1,200 genes whose expression was significantly modulated in TGF $\beta$ <sub>1</sub>-treated or CK2 $\beta$ -depleted cells, as compared to WT parental cells. As shown in Figure 5A, of the 439 (365+74) genes down-regulated in TGF $\beta$ <sub>1</sub>-treated cells, only 17 % (74 genes) were also repressed in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells (left panel). In the same way, upregulated genes were much more abundant in the TGF $\beta$ <sub>1</sub>-treatment condition (Figure 5A, right panel), indicating that  $\Delta$ CK2 $\beta$ -induced EMT may be dependent on effectors acting downstream of cytoplasmic signal amplification that leads to more pleiotropic effects. As expected, SNAIL1 transcriptional level was strongly elevated (8- to 10-fold up: figure 5B) in correlation with low expression of CK2 $\beta$ . Similar amounts of transcripts were observed for this gene in TGF $\beta$ <sub>1</sub>-treated cells, even four days after occurrence of the first steps of EMT (i.e loss of cell cohesion and actin relocalization). Interestingly, although SNAIL2/SLUG was equally significantly induced upon TGF $\beta$ <sub>1</sub> addition, transcription of this SNAIL1 homologue was systematically repressed in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells (3- to 5-fold down: figure 5B). This result, confirmed by detailed RT-PCR analysis (figures 5C and D), corroborates with previous studies that highlighted differential mechanisms of regulation for SNAIL and SLUG proteins [3, 45-47]. Furthermore, we also denoted a slight induction of ZEB1 ( $\delta$ EF1) and ZEB2 (SIP1), that are known to act independently or in cooperation with SNAIL proteins in order to set ahead EMT and cell migration [2, 48]. However, this approach revealed that no significant regulation could be noticed regarding the mRNA level of other described EMT-promoting transcription factors, indicating that the new synthesis of members of the bHLH family is not a pre-requisite for repression of E-cadherin in MCF10A mammary epithelial cells (figure 4B). Among EMT-related genes under SNAIL1 control, *CDH1*, *OCLN*, *CLDN1*, *CLDN7*, *COL2A1* and *MUC1* were commonly repressed in TGF $\beta$ <sub>1</sub>-treated cells or  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells, as well as, *RAB25*, a member of RAS oncogene family. On the contrary, several SNAIL1-known-target genes such as those encoding the Vitamin D receptor (*VDR*) and Keratin 17 (*KRT17*) [49-52], were specifically blunted only in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells (Figures 5E and 5F). Moreover, several mesenchymal-linked genes (*CDH2*, *FNI*, *VIM*, *SPARC*) or pro-migratory genes

(*ACTA2/α-SMA*, *FSP1/S100A4*, *MYL9*) were found to be commonly upregulated in both EMT-inducing conditions (Figure 5G). Collectively, these results highlight the determining role of SNAIL1 upregulation in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -induced EMT and its ability to induce, in cooperation with ZEB factors (but not SLUG and bHLH factors), a complete EMT program affecting cell-cell junctions related-genes as well as ECM, cytoskeleton and apoptosome components. Moreover, this microarray comparative approach also demonstrates for the first time that many genes under control of TGF $\beta$ 1 signaling are not strictly required to generate a complete EMT phenotype in MCF10A cells. Importantly, these findings are consistent with the fact that TGF $\beta$  family members can function as pleiotropic regulators for many processes in the mammary gland epithelium [53-54]. Finally, detailed transcripts analysis revealed that SNAIL1 transcriptional activation could be maintained over several weeks after EMT induction, supporting the possibility of positive feedback loops between SNAIL proteins and their own promoters that would depend on the cellular context [3, 32, 55-56].



### **$\Delta$ CK2 $\beta$ -induced EMT is dependent on SNAIL1 expression.**

The strong elevation of SNAIL1 transcriptional level linked to EMT induction observed in response to CK2 $\beta$  silencing suggests that  $\Delta$ CK2 $\beta$ -related phenotype may be a dependent consequence of specific SNAIL1 repressor activity. To examine this possibility, we developed a double knockdown system, based on lentiviral shRNA transduction targeting both SNAIL1 and CK2 $\beta$  in MCF10A cells. In association with Mock and CK2 $\beta$ -targeting sequences, two SNAIL1-shRNAs (SH1- and SH2-) were designed as described in table 1. Parental MCF10A cells were infected with SH1- or SH2-SNAIL1 viral particles and then, CK2 $\beta$  expression was turned-off using the previously described specific sequence. Finally, double Neomycin/Puromycin selection pressure was applied until total removal of non-encoding cells. We first verified that SNAIL1 knockdown had no effect on CK2 $\beta$  expression using RT-qPCR, immunoblotting and kinase activity experiments (Figures 6A-B, 6F and G, respectively) and EMT markers were further analyzed. As shown in figure 6C by phalloidin staining, cytoskeleton remodelling generating stress fibres in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells (panel d) was prevented by SNAIL1-shRNAs (panels e and f). Additionally, no particular morphological change could be noticed in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells expressing SNAIL1 targeting-sequences (compare panels a with b and c). Immunofluorescence analysis revealed that the E-/N-cadherin switch observed in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells was also precluded by both SNAIL1-shRNAs (Figure 6C, compare panels g to h and i, and j to k and l respectively). These results were confirmed by Immunoblotting that also demonstrated that regulation of other EMT-related markers such as vimentin or cytokeratin 5/6 could be turned-off by SNAIL1-shRNAs (Figure 6F). Finally, regulation of the E-cadherin promoter was assessed in these cells showing that repression detected in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -MCF10A cells was also dependent of SNAIL1 expression (Figure 6D). As expected, a mirror image was obtained for vimentin promoter activity (Figure 6E), consistent with previously described functions of SNAIL1 in direct induction of mesenchymal-related genes [2-3]. Taken together, these three complementary approaches provide evidence that SNAIL1-knockdown blunted the  $\Delta$ CK2 $\beta$ -induced EMT, implying that SNAIL1 may act as a downstream effector of CK2 and that expression of this protein is necessary for EMT induction triggered by CK2 $\beta$  silencing.

## **DISCUSSION**

In the current study, we demonstrated that the CK2 $\beta$  regulatory subunit is required for efficient CK2 $\alpha$ -mediated SNAIL1 phosphorylation and that interaction of these three proteins is a pre-requisite to prevent the induction of SNAIL-dependent-EMT in MCF10A mammary epithelial cells. Therefore, SNAIL1 belongs to the class of CK2 substrates whose phosphorylation is highly dependent on the presence of the regulatory subunits: the “CK2 $\beta$  dependent substrates”. To date, this class of substrates includes various proteins and very little is known about mechanisms underlying the modulation of the access to the catalytic site by CK2 $\beta$ . Several transcription factors are phosphorylated by CK2 in a CK2 $\beta$  dependent manner. For example, CK2 $\beta$  acts as a key positive regulator for Olig2 activation by phosphorylation, a pre-requisite for normal development of oligodendrocyte precursor cells (OPCs), both *in vivo* and *in vitro* [17]. In COS7 cells, the secretion of Engrailed2 (cEN2) is specifically inhibited by CK2 phosphorylation and its binding to CK2 $\alpha$  subunit alone has been shown to be fourfold weaker compared to CK2  $\alpha_2\beta_2$  tetrameric holoenzyme [16]. Similarly, S6K1 nuclear translocation upon PI3Kinase or mTOR signaling activation is abrogated by CK2  $\alpha_2\beta_2$ -driven phosphorylation of S<sup>17</sup> that is recognized and bound by the CRM1 exportin [57]. On the other hand, CK2 $\alpha$  alone phosphorylates GST-BMAL1, while CK2 $\beta$  inhibited this post-translational modification in a dose-dependent manner. Importantly, gene silencing of CK2 $\alpha$  or mutation of the highly conserved CK2-phosphorylation site in BMAL1 S<sup>90</sup>, results in impaired nuclear BMAL1 accumulation and disruption of clock function in drosophila [58]. Finally, the two other “acidic-specific kinases” GSK3 $\beta$  and CK1 are also known to regulate phospho-degrons of many transcription factors and proto-oncogenic proteins including  $\beta$ -catenin, cyclin D1, c-myc, c-jun and SNAIL1. Moreover, these two kinases have been recently implicated in the degradation of molecular clockwork components such as BMAL1 that is primed for ubiquitination under control of coordinated phosphorylation events [59-60].

A particularly interesting example of signal integration through multiple phosphorylations is hierarchical phosphorylation [33, 36, 61-62], also termed phosphoamino acid “primed” phosphorylation [63]. GSK3 $\beta$ , together with protein-kinases CK1 and CK2 are three kinases that recognize phosphorylated residues as specificity determinants in the proximity of their target hydroxylamino acid. Such substrates are primed by introducing the first phosphorylation followed by subsequent phosphorylation(s) by either the same or another kinase, thus establishing a “hierarchy” in the sequential phosphorylations. In most cases, GSK3 $\beta$  tends to better phosphorylate primed substrates, as seen in the case of glycogen synthase (GS) C-terminal Serine Rich Domain that requires priming by CK2 for phosphorylation of residues S<sup>644</sup>, S<sup>648</sup>, and S<sup>652</sup> [62, 64-65]. This covalent modification subsequently primes GS for sequential phosphorylation of S<sup>641</sup>, S<sup>645</sup>, S<sup>649</sup> and S<sup>653</sup> by GSK3 $\beta$  and inhibited GS activity [36]. Similarly, prior phosphorylation of the Akt/PKB inhibitor PTEN on S<sup>370</sup> by CK2 strongly increased its phosphorylation on T<sup>366</sup> by GSK3 $\beta$ , leading to protein destabilization [66-67]. Additionally, it has also been evidenced that CK2 can directly

phosphorylate Akt/PKB (an inhibitor of GSK3 $\beta$  pathway) on serine S<sup>129</sup> to promote its maximal activation and protect cells against senescence and apoptosis [68].

In the past decency, several data have highlighted the role of GSK3 $\beta$  in the regulation of SNAIL1 phosphorylation to promote its cytoplasmic localization and accelerate its turn-over [3, 30-31, 69-71]. Recently, two reports have contributed to a better understanding of the complexity of post-translational modifications that regulates SNAIL1 cell behaviour. First, Y. Xu and colleagues demonstrated that CK1 could positively regulate and prime second phosphorylation of SNAIL1 by GSK3 $\beta$ . This dual phosphorylation of serines S<sup>96</sup>, S<sup>100</sup>, S<sup>104</sup> and S<sup>107</sup> is responsible for  $\beta$ TrCP E3 ubiquitin ligase recognition of SNAIL1 protein and its subsequent proteasomal degradation (figure 7). In consequence, CK1 inhibition by chemical inhibitors or specific siRNAs led to SNAIL1 protein stabilization and was followed by repression of E-cadherin and Claudin-1 expression [35]. Secondly, A. Cano's lab provided evidence that PKA and CK2 can respectively phosphorylate S<sup>11</sup> and S<sup>92</sup> to regulate protein stabilization and repressor activity [4]. In our experiments, we observed that CK2 $\beta$ -dependent phosphorylation of S<sup>92</sup> had a strong impact on SNAIL1 protein expression associated with a decrease of its global phosphorylation (figures 1 et 2). Moreover, CK2 promoted a cumulative positive effect on GSK3 $\beta$ -mediated SNAIL1 phosphorylation suggesting that both kinases can negatively regulate SNAIL1 stability through its hierarchal phosphorylation (Figure 1C). Altogether, these data suggest that, as many other proteins, SNAIL1 post-translational stabilisation could be regulated by a series of coordinated phosphorylation events of its serine rich domain involving CK1, CK2 and GSK3 $\beta$  (Figure 7). The hypothesis of a cooperative mechanism is reinforced by the fact that inhibition of each of all these three serine/threonine kinases leads to EMT programs in several epithelial models [30, 32, 35]. Importantly, CK1 and GSK3 $\beta$  have been implicated in the generation of a consensus motive for SNAIL1 proteasomal degradation mediated by  $\beta$ -TrCP E3-polyubiquitine ligase using transfection or recombinant proteins in different epithelial cell lines [30-31, 35]. Using MCF10A cells, we failed to detect endogenous levels of both GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -TrCP proteins associated to recombinant WT MBP-SNAIL1. In a close future, extensive *in vitro* biochemical analyses combining highly resolutive detection methods, efficient mass spectrometry and amino-acid-specific antibodies should lead to a better understanding of both kinetic and hierarchy of phosphorylation and ubiquitination events governing SNAIL1 expression during EMT.

Different studies have contributed to highlight the complex regulation of SNAIL factors whose protein level is intimately linked to their transcriptional regulation. For example, SNAIL1 can repress its own transcription [55] while conversely, SNAIL2 seems to be self-activated in avian neural crest [56]. Recently, it has been proposed by A.G. Herreros and others that ectopic SNAIL1 can also increase its own synthesis in a cell-dependent manner, with a strong correlation to E-cadherin expression levels. In this model, EMT should be driven by coordinated events essentially implicating SNAIL1, NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin signaling [3]. Several studies have provided evidence for negative effects of E-cadherin on the activity of these three pathways and it is now well established that they all can directly or indirectly associate to promote CDH1 gene repression and acquisition of mesenchymal-traits [3, 72-77]. Interestingly, CK2 can positively modulate NF- $\kappa$ B and Wnt responses at different levels in order to

promote cell survival, resistance to apoptosis and inflammatory response [78-81]. Conversely, this kinase also cooperates with GSK3 $\beta$  and CK1 to phosphorylate E-cadherin cytoplasmic domain in order to promote its interaction with  $\beta$ -catenin and subsequent stabilization of adherens junctions' integrity [25-29]. Unfortunately, the dependence of these substrates to the CK2 $\beta$  regulatory subunit has not been investigated so far (as well as for GS, PTEN and Akt/PKB). Further investigations would be necessary to elucidate the complexity of the "post-translational code" regulating both stability and subcellular localization of these proteins.

A positive feedback loop can also take place in this highly complex system considering the capacity of SNAIL1 to block the synthesis of Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), that can act as a physiological repressors for both SNAIL1 and NF- $\kappa$ B [82-83]. In our experiments, CK2 $\beta$  depletion in MCF10A cells led to continuous synthesis of SNAIL1 mRNA that was maintained even after several weeks of culture. Using a microarray approach, we could observe that this induction was associated with CDH1 and ER- $\alpha$  transcriptional repression as well as upregulation of several Wnt/ $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B related-target genes (full microarray is enclosed in supplementary data available online). In the same way, GSK3 $\beta$  has been shown to play an important role in both transcriptional and post-translational regulation [32] and it is now well established that inhibiting its kinase activity is a required step to ensure SNAIL1 efficient activity [3, 70]. Importantly, induction of mesenchymal-related proteins such as vimentin or N-cadherin was abrogated by SNAIL1 inhibition triggered by stable RNA-interference, evidencing the key role of this transcription factor in positive regulation of migratory-promoted genes (figure 6). Collectively, these results highlight the determining role of SNAIL1 upregulation in  $\Delta$ CK2 $\beta$ -induced EMT and its ability to induce, in cooperation with ZEB factors (but not SLUG and bHLH factors), a complete EMT program affecting genes related to cell-cell contacts as well as ECM, cytoskeleton and apoptosome components. Finally, our microarray comparative analysis also showed that many genes under control of TGF $\beta$ 1 signaling are not strictly required to generate a complete EMT phenotype in MCF10A cells.

In MCF10A cells, both CK2  $\alpha$  and  $\alpha'$  catalytic subunits contribute synergistically to the CK2 activity and can potentially substitute each other in SNAIL1 phosphorylation. In this study, we provide evidence that silencing of both CK2 $\alpha$  and  $\alpha'$  catalytic subunits is required to induce an EMT-like phenotype similar to the one obtained with a single CK2 $\beta$  siRNA (figures 2 and SD-2). Unexpectedly, although CK2 $\alpha\alpha'$ -siRNA treated cells were not viable over time, stable CK2 $\beta$  knockdown engendered mesenchymal-like cells that were perfectly viable. We hypothesize that CK2 $\beta$  protein levels in Knock Down Cells would be slightly higher than in previously described Knock-Out Mice cells [7] and might provide sufficient amounts of regulatory subunits to ensure survival factors phosphorylation by CK2  $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme. Therefore, we suspect that affinity of CK2 $\beta$  regulatory subunits for cell cycle and apoptosis-related proteins could be stronger than the one of factors involved in differentiation or cell plasticity. In accordance with these assumptions, CK2 $\beta$ -depleted cells exhibited a robust proliferative potential in association with morphological changes following SNAIL1 upregulation and E-cadherin repression as well as cytoskeleton remodelling (Figure SD-2E to SD-2H).

It has been proposed that a coordinated transcriptional regulation of all three active human CK2 genes is decisively determined by Ets family members [84]. Surprisingly, we noticed that CK2 $\beta$  silencing in MCF10A cells did not affect CK2 $\alpha$  or CK2 $\alpha'$  RNA levels but was correlated with a specific decreased expression of CK2 $\alpha'$  protein (Figures 2 and SD-2). These findings indicate a close relationship and a possible inter-stabilization between these two CK2 subunits in mammary epithelial cells. Recently, a systematic siRNA screening approach in MCF10A cells led to the identification of CK2 $\alpha'$  as a gene regulating epithelial cell migration [85].

In conclusion, this study demonstrates that CK2 $\alpha$  phosphorylation of SNAIL1 is mediated by CK2 $\beta$  regulatory subunit and that this modification is required for subsequent GSK3 phosphorylation. Moreover, we showed that CK2 $\beta$  silencing in nontransformed epithelial cells triggered EMT-related morphological changes associated with SNAIL1 upregulation and stabilization together with expression of mesenchymal-related markers, enhanced migratory potential and acquisition of de-differentiation traits. Finally, a decreased CK2 $\beta$  expression was correlated with SNAIL1 upregulation and cadherin switching in breast tumor samples, suggesting that CK2 subunits ratio can be determinant for breast cancer progression involving SNAIL1 regulation. Therefore, our findings support a mechanism whereby CK2 controls epithelial cell morphology and motility through its regulatory subunit CK2 $\beta$ . Changes in CK2 $\beta$  expression may result in the deregulation of signaling pathways that normally dictate the expression of genes involved in the maintenance of the epithelial morphology.



## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

**Vector Constructions :** E-cadherin, vimentin and SNAIL human promoters fused to Firefly luciferase (pGL3 Basic, Promega) or HTK promoter fused to Renilla luciferase (from pRL-TK, Promega) were sub-cloned into pSIV-GAE Vector [86] containing SIV Packaging, LTR sequences and the Puromycin resistance gene for selection of stable cell lines. All shRNA sequences (table 1) were synthesized as primers, pair annealed and sub-cloned into pLKO.1 vector (Sigma Aldrich) containing U6 human shRNA promoter, HIV packaging Psi sequence and LTR repeats. This vector also contains the Puromycin or Neomycin resistance genes for selection of stable cell lines. For pMCSV-neo HA-CK2 $\beta$  neo, see [17]. Human SNAIL1 cDNAs (WT and mutants) were subcloned either in pMAL-C2 vector for bacterial recombinant expression in BL21 DE3 or in pLVX-vector for eukaryotic expression.

**Production and Transduction of Lentiviral Vectors :** To accomplish transgene incorporation into lentiviral capsids, pSIV-GAE-vectors were co-transfected with pSIV15 (encoding SIV gag and pol elements) and pGRev (encoding SIV Rev Element and VSV-G) into 293T cells using Lentiphos<sup>TM</sup> HT (Clontech). For pLKO.1 (and pLVX) vectors, a pSPAX.2 packaging vector (encoding HIV Gag, Pol and Rev proteins) was used in combination with pMD2.G (encoding VSV-G). In brief, the DNA/Lentiphos<sup>TM</sup> complexes were added to a suspension of 293T cells ( $5 \times 10^6$  in 10 ml of serum-supplemented medium) and incubated overnight. The medium was then replaced with complete DMEM containing 10% foetal calf serum and the virus-containing supernatants were harvested 48 hours post-transfection. All virus stocks were filtrated at 0.45 $\mu$ m, aliquoted into 1.5mL tubes and frozen at -80°C. For infection, MCF10A cells were plated into 24 well-plates ( $5 \times 10^4$  in 500 $\mu$ L of serum-supplemented Growth medium). The day after, adherent cells were incubated with lentiviral particles (1-5 MOI) diluted in 250 $\mu$ l of serum-supplemented medium containing 8 $\mu$ g/mL Polybrene. After 4h, 500 $\mu$ L of medium were added to cultures and transduction was maintained for 16 hours before to wash cells and change the medium. For transient assays, cells were analysed 36-48h post infection. For stable transduction, Puromycin or neomycin selection started 36h post-infection (at the concentration of 1 $\mu$ g/mL or 1 mg/ml respectively) and was maintained during all the timecourse of our experiments.

**Cell Culture, transfection and retroviral infection :** MCF10A cells were grown as described previously [87]. HaCaT cells were grown in the Dulbecco's Modified Eagles' medium (DMEM containing 4.5g/L Glucose) plus 10% Foetal calf serum, 100U/ml penicillin and 50mg/ml streptomycin. Recombinant human TGF $\beta$ 1 was used to induce EMT (R&D Systems); Transient silencing of CK2 subunits were performed using siRNA indicated in supplemental data table 2 and retrotransfection with Lipofectamine according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Stable silencing of gene expression in all indicated cells was accomplished by transduction with pLKO.1 lentiviruses followed by selection either with Puromycin or neomycin as indicated in Supplemental data table 1. Vector



Constructions and Methods for lentiviral production and delivery are also described in Supplemental experimental Procedures. The silencing efficiency was evaluated both at the protein and/or mRNA level using western blot and RT-qPCR analysis respectively.

**Analysis of promoter activity :** EMT induction was measured by transduction of either the E-cadherin or the vimentin Luc-reporter lentiviruses as indicated in the figure legends. *Renilla reniformis* luciferase plasmid (pRL-TK or pRL-CMV) were used to normalize transduction efficiency). SNAIL1 promoter reporter, kindly provided by L. Larue [38], was directly transfected using Effectene reagent (QIAGEN). After 24 to 48h, cells were washed, lysed, and subsequently assessed for Firefly and Renilla luciferase activities using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Triplicates were systematically included and experiments were repeated at least three times. Promoter activity is reported as the mean  $\pm$  SD.

**Protein Production :** Using EcoRI and BamHI restriction sites, SNAIL1 human sequence from pEGFP-SNAIL1 WT [30] was sub-cloned into pMAL-C2 Vector (New England Biolabs) containing Maltose Binding Protein sequence under IPTG control and the Ampicillin resistance gene for selection of positive clones. The resulting vector expressing MBP-SNAIL1 fused sequence was further transformed into the strain *Escherichia coli* BL21 for Protein expression. Cells harboring this expression plasmid were grown in LB broth supplemented with Ampicillin up to midlog phase at 37°C and induced with 1 mM IPTG for 3 h. Cells were harvested and resuspended in lysis buffer [50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 20  $\mu$ M DTT, 0.05% (m/v) lysozyme + protease inhibitors (Sigma, P8465)] and were subsequently lysed by sonication during 400s (Sonimass S20). The lysate was salt adjusted to 0.5M NaCl, centrifuged, and the supernatant was loaded on a 500 $\mu$ L amylose resin column (NEB). Columns were washed with 10 ml of wash Buffer [50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 500mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 0.25% (V/V) Tween20, 20  $\mu$ M DTT] and eluted with Maltose 20mM in 50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl. The peak fractions were pooled and applied to a gel filtration column to remove maltose (Bio-Rad Biospin 6 columns).

**Pull Down :** MCF10A Cells were lysed in TrisHCl 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, DTT 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NP40 0.5% supplemented with Phosphatases and Proteases Inhibitors (Sigma P2850, P5726, P8340). Then, 500 $\mu$ g of cleared lysate was pre-incubated on 50 $\mu$ L amylose resin during 2 hours and clarified at 12,000rpm for 5 min. The resulting supernatant was half-separated and 250 micrograms of this pre-cleared lysate were loaded on 50  $\mu$ L of amylose resin (New England Biolabs) and 5 $\mu$ g of MBP or MBP-SNAIL1 recombinant protein. After overnight binding, the resin was washed 3 times in TrisHCl 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, DTT 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NP40 0.5% and eluted with 100 $\mu$ L 2X Laemmli buffer supplemented with 10 mM maltose and 1mM DTT. 30 $\mu$ L of each experiment were loaded on a 12% SDS-PAGE gel for Western blot analysis.

**CK2 activity :** Measure of CK2 activity was as described previously [88] following the P-cellulose filter procedure. Briefly, reaction was started by addition of the sample (3µl) to the reaction mixture (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 20 µM ATP, 15 µM of either the synthetic peptide RRREDEESDDEE or eIF2β peptide MSGDEMIFDPTMSKKKKKKKKP [15], and 1µCi of [γ-32P] ATP/reaction in a final volume of 20 µl. Reaction was performed at 22°C for 5 min. Phosphorylation assays using SNAIL1 recombinant protein (1µg) were performed in the same buffers. Time and temperature experimental conditions are defined into figures' text.

**Primary Antibodies :** Home-made monoclonal CK2beta (βM) and polyclonal CK2alpha (αCoc) Antibodies were respectively used at was diluted dilutions 1/500 and 1/2000 [89]. Polyclonal CK2alpha' was purchased from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX) ; anti-E-cadherin, anti-N-cadherin (clone 32) from BD Biosciences (Pont de Claix, France) ; SNAIL1 H130 from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) ; vimentin (clone Vim13.2) from Sigma-Aldrich (Lyon, France) ; cytokeratin 5/6 (clone D5/16 B4) from Chemicon and AntiHA (clone 12CA5) was from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

**Immunoblotting :** For immunoblot analysis of proteins, lysates of cells were prepared in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol, 2 mM EDTA, and 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma P8340), phosphatase inhibitor cocktails 1 and 2 (Sigma P2850, P5726). Lysates were cleared by centrifugation and equivalent amounts of protein were denatured with Laemmli 5X sample buffer containing 50mM DTT. Samples were then processed to SDS-Page electrophoresis and transferred to Nitrocellulose membrane (Hybond-P, Amersham Biosciences). Immunoblotting was performed using previously described primary antibodies. Membranes were washed with PBS-Tween 0,1% and incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase. Detection was achieved by using Enhanced Chemiluminescence method (ECL Plus, GE Healthcare) and Fusion FX acquisition system (Vibert-Lourmat). Verification of equal loading was done by immunodetection of HSP90 (Stressgen clone13F1 1/1000), actin or γ-tubulin (home-made).

**Immunofluorescence :** Cells were seeded on coverslips and treated as described in Result figures. Fixation was achieved in 4% paraformaldehyde for 10 min at 20 °C, or in 100% Methanol for 5 min at -20°C, followed by permeabilization in 0.1% Triton X100. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C before to add Alexa 488- or Cy3-labeled secondary antibodies (goat-anti-mouse IgGs). F-actin was visualized by staining with Alexa Fluor®-labeled Phalloidin (Invitrogen) and nuclei were colored with Hoechst 33258 (1µg/ml in PBS). Finally, cells were analyzed using either a Zeiss Axiovert 200M microscope or the Leica TCS-SP2 laser scanning confocal apparatus coupled to Leica DMIRBE microscope.

**RT-PCR :** mRNA were isolated using Absolutely RNA miniprep kit (Stratagene) and their concentrations were determined by NanoDrop procedure. Reverse Transcription was performed with StrataScript QPCR cDNA Synthesis kit, according to the manufacturer's instructions (Stratagene). qPCR experiments were performed using Full Velocity SYBR Green qPCR Master Mix in a Mx3000P instrument (Stratagene) with gene-specific primers (forward and reverse) designed from PrimerQuest server (table 2).. The housekeeping gene hHPRT was used as a calibrating standard.

**Microarray analysis :** The microarray analysis was performed with RNAs isolated from parental and the following derived- MCF10A cells:  $\Delta$ CK2 $\beta$ -,  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ -, and TGF $\beta$ 1-treated cells (2ng/ml for 72h) using two independent experiments for each condition (duplicates). Total RNA extraction was performed using Absolutely RNA Miniprep kit (Agilent). cDNA was Cy3-labeled and hybridized on Agilent Whole Human Genome microarrays (44K). Raw data from scanned images were extracted using Feature Extraction version 9.5 and were normalized with the vsn method (R package limma, Smyth and Speed, 2003) and differential analysis was performed with the SAMR package [90]. Significantly differentially expressed genes were selected based on the *fdr* value ( $\leq 0.01$ ).

**Statistical Analysis :** Statistical analyses of the qRT-PCR and cell behavior experiments were performed with Microsoft Excel software. The raw data were processed to calculate the mean and the s.e.m. (as indicated by error bars in the figures). Statistical significance was evaluated by Student's *t*-test.

## REFERENCES

1. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-890.
2. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
3. De Herreros, A.G., et al., *Snail Family Regulation and Epithelial Mesenchymal Transitions in Breast Cancer Progression*. Journal of mammary gland biology and neoplasia: p. 1-13.
4. MacPherson, M.R., et al., *Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A*. Mol Biol Cell. 2010 Jan;21(2):244-53. Epub 2009 Nov 18.
5. Thornburg, W. and T.J. Lindell, *Purification of rat liver nuclear protein kinase NII*. J Biol Chem, 1977. **252**(19): p. 6660-5.
6. Cochet, C. and E.M. Chambaz, *Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. Isolation of the two subunits and renaturation experiments*. J Biol Chem, 1983. **258**(3): p. 1403-6.
7. Buchou, T., et al., *Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 908-15.
8. Filhol, O., et al., *Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 975-87.
9. Filhol, O. and C. Cochet, *Protein Kinase CK2 in Health and Disease*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11): p. 1830-1839.
10. Pinna, L.A., *Protein kinase CK2: a challenge to canons*. Journal of cell science, 2002. **115**(20): p. 3873.
11. Bibby, A.C. and D.W. Litchfield, *The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2*. International journal of biological sciences, 2005. **1**(2): p. 67.
12. Olsen, B.B. and B. Guerra, *Ability of CK2 to selectively regulate cellular protein kinases*. Molecular and cellular biochemistry, 2008. **316**(1): p. 115-126.
13. Yde, C.W., et al., *The regulatory -subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the onset of mitosis*. Oncogene, 2008. **27**(37): p. 4986-4997.
14. Gyenis, L. and D.W. Litchfield, *The emerging CK2 interactome: insights into the regulation and functions of CK2*. Molecular and cellular biochemistry, 2008. **316**(1): p. 5-14.
15. Poletto, G., et al., *The Regulatory beta Subunit of Protein Kinase CK2 Contributes to the Recognition of the Substrate Consensus Sequence. A Study with an eIF2beta-Derived Peptide*. Biochemistry, 2008.
16. Maizel, A., et al., *Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process*. Development, 2002. **129**(15): p. 3545.
17. Huillard, E., et al., *Disruption of CK2{beta} in Embryonic Neural Stem Cells Compromises Proliferation and Oligodendrogenesis in the Mouse Telencephalon*. Mol Cell Biol.
18. Pagano, M., et al., *The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update*. Biochem. J, 2008. **415**: p. 353-365.
19. Tsai, S.C. and E. Seto, *Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(35): p. 31826.
20. Canton, D.A. and D.W. Litchfield, *The shape of things to come: an emerging role for protein kinase CK2 in the regulation of cell morphology and the cytoskeleton*. Cellular signalling, 2006. **18**(3): p. 267-275.
21. Deshiere, A., et al., *Protein kinase CK2 and cell polarity*. Mol Cell Biochem, 2008. **316**(1-2): p. 107-13.
22. Ji, H., et al., *EGF-Induced ERK Activation Promotes CK2-Mediated Disassociation of [alpha]-Catenin from [beta]-Catenin and Transactivation of [beta]-Catenin*. Molecular cell, 2009. **36**(4): p. 547-559.
23. Bek, S. and R. Kemler, *Protein kinase CKII regulates the interaction of {beta}-catenin with {alpha}-catenin and its protein stability*. Journal of cell science, 2002. **115**(24): p. 4743.
24. Song, D.H., et al., *CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(26): p. 24018.
25. Lickert, H., et al., *Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(7): p. 5090.
26. Serres, M., et al., *The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2*. Experimental cell research, 2000. **257**(2): p. 255-264.
27. Catimel, B., et al., *In situ phosphorylation of immobilized receptors on biosensor surfaces: Application to E-cadherin/[beta]-catenin interactions*. Analytical biochemistry, 2006. **357**(2): p. 277-288.
28. Joep, R.S. and G.V.W. Johnson, *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. Trends in Biochemical Sciences, 2004. **29**(2): p. 95-102.
29. Wu, G., et al., *Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6*. PLoS One, 2009. **4**(3).
30. Zhou, B.P., et al., *Dual regulation of Snail by GSK-3-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition*. Nature Cell Biology, 2004. **6**(10): p. 931-940.
31. Yook, J.I., et al., *Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(12): p. 11740.
32. Bachelder, R.E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of cell biology, 2005. **168**(1): p. 29.

33. Ferrarese, A., et al., *Chemical dissection of the APC Repeat 3 multistep phosphorylation by the concerted action of protein kinases CK1 and GSK3*. Biochemistry, 2007. **46**(42): p. 11902.
34. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(10): p. 769-776.
35. Xu, Y., et al., *Role of CK1 in GSK3 -mediated phosphorylation and degradation of Snail*. Oncogene, 2006. **25**(15): p. 2273-84.
36. Forde, J.E. and T.C. Dale, *Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate*. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2007. **64**(15): p. 1930.
37. Charafe-Jauffret, E., et al., *Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers*. Oncogene, 2006. **25**(15): p. 2273-84.
38. Barberà, M.J., et al., *Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells*. Oncogene, 2004. **23**(44): p. 7345-7354.
39. Nieto, M., *Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives*. Int J Dev Biol, 2008. **52**.
40. Seton-Rogers, S.E., et al., *Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(5): p. 1257.
41. Maeda, M., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock, *Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 873-87.
42. Zavadil, J., et al., *Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6686-91.
43. Moreno-Bueno, G., et al., *Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition*. Cancer research, 2006. **66**(19): p. 9543.
44. Vetter, G., et al., *Time-resolved analysis of transcriptional events during SNAI1-triggered epithelial to mesenchymal transition*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **385**(4): p. 485-491.
45. Come, C., et al., *Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5395-402.
46. Moreno-Bueno, G., et al., *Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition*. Cancer research, 2006. **66**(19): p. 9543.
47. Martin, T.A., et al., *Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer*. Annals of surgical oncology, 2005. **12**(6): p. 488-496.
48. Vandewalle, C., F. Van Roy, and G. Berx, *The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(5): p. 773-787.
49. Peña, C., et al., *E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAI1 and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations*. Human molecular genetics, 2005. **14**(22): p. 3361.
50. Pálmer, H.G., et al., *The transcription factor SNAI1 represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer*. Nature medicine, 2004. **10**(9): p. 917-919.
51. Joyce, T., et al., *A molecular signature for Epithelial to Mesenchymal transition in a human colon cancer cell system is revealed by large-scale microarray analysis*. Clinical and Experimental Metastasis, 2009. **26**(6): p. 569-587.
52. Blick, T., et al., *Epithelial Mesenchymal Transition Traits in Human Breast Cancer Cell Lines Parallel the CD44 hi/CD24 lo/-Stem Cell Phenotype in Human Breast Cancer*. Journal of mammary gland biology and neoplasia: p. 1-18.
53. Wakefield, L.M., E. Piek, and E.P. Bottinger, *TGF-beta signaling in mammary gland development and tumorigenesis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. **6**(1): p. 67-82.
54. Flanders, K.C. and L.M. Wakefield, *Transforming growth factor-(beta)s and mammary gland involution; functional roles and implications for cancer progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(2): p. 131-44.
55. Peiró, S., et al., *Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(7): p. 2077.
56. Sakai, D., et al., *Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development*. Development, 2006. **133**(7): p. 1323.
57. Panasyuk, G., et al., *Nuclear export of S6K1 II is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(42): p. 31188.
58. Tamaru, T., et al., *CK2 phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock*. Nature structural & molecular biology, 2009. **16**(4): p. 446-448.
59. Sahar, S., et al., *Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation*. PLoS One. **5**(1): p. e8561.
60. Spengler, M.L., et al., *A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2009. **8**(24).
61. Marin, O., et al., *A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(18): p. 10193.
62. DePaoli-Roach, A.A., et al., *Multiple phosphorylation of rabbit skeletal muscle glycogen synthase. Evidence for interactions among phosphorylation sites and the resolution of electrophoretically distinct forms of the subunit*. J Biol Chem, 1983. **258**(17): p. 10702-9.
63. Harwood, A.J., *Regulation of GSK-3-A Cellular Multiprocessor*. Cell, 2001. **105**(7): p. 821-824.
64. Zhang, W.M., A.A. Depaoli-roach, and P.J. Roach, *Mechanisms of multisite phosphorylation and inactivation of rabbit muscle glycogen synthase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **304**(1): p. 219-225.
65. Nielsen, J.N. and E.A. Richter, *Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise*. Acta Physiologica Scandinavica, 2003. **178**(4): p. 309-319.

66. Maccario, H., et al., *PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366*. The Biochemical Journal, 2007. **405**(Pt 3): p. 439.
67. Al-Khoury, A.M., et al., *Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(42): p. 35195.
68. Di Maira, G., et al., *Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB*. Cell Death & Differentiation, 2005. **12**(6): p. 668-677.
69. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Switching on-off snail: LOXL2 versus GSK3*. Cell Cycle, 2005. **4**(12): p. 1749-1752.
70. Yook, J.I., et al., *A Wnt-Axin2-GSK3 cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells*. Nature Cell Biology, 2006. **8**(12): p. 1398-1406.
71. Bachelder, R.E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription*. The Journal of cell biology, 2005. **168**(1): p. 29.
72. Julien, S., et al., *Activation of NF- $\kappa$ B by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition*. Oncogene, 2007. **26**(53): p. 7445-7456.
73. Strippoli, R., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF- $\kappa$ B/Snail1 pathway*. Disease Models & Mechanisms, 2008. **1**(4-5): p. 264.
74. Stemmer, V., et al., *Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin*. Oncogene, 2008. **27**(37): p. 5075.
75. Huber, M.A., et al., *NF- $\kappa$ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(4): p. 569-581.
76. Wu, Y., et al., *Stabilization of Snail by NF- $\kappa$ B Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion*. Cancer cell, 2009. **15**(5): p. 416-428.
77. Solanas, G., et al., *E-cadherin controls  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B transcriptional activity in mesenchymal gene expression*. Journal of cell science, 2008. **121**(13): p. 2224.
78. Pinna, L.A. and J.E. Allende, *Protein Kinase CK2 in Health and Disease: Protein kinase CK2: An ugly duckling in the kinome pond (Multi-author Review)*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11-12): p. 1795-1799.
79. Ahmad, K.A., et al., *Protein kinase CK2-a key suppressor of apoptosis*. Advances in Enzyme Regulation, 2008. **48**: p. 179.
80. Singh, N.N. and D.P. Ramji, *Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response?* Journal of Molecular Medicine, 2008. **86**(8): p. 887-897.
81. Dominguez, I., G.E. Sonenshein, and D.C. Seldin, *Protein Kinase CK2 in Health and Disease*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11): p. 1850-1857.
82. Dhasarathy, A., M. Kajita, and P.A. Wade, *The Transcription Factor Snail Mediates Epithelial to Mesenchymal Transitions by Repression of Estrogen Receptor- $\alpha$* . Molecular Endocrinology, 2007. **21**(12): p. 2907.
83. Wang, X., et al., *Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(4): p. 470-478.
84. Ackermann, K., et al., *The catalytic subunit alpha'gene of human protein kinase CK2 (CSNK2A2): genomic organization, promoter identification and determination of Ets1 as a key regulator*. Molecular and cellular biochemistry, 2005. **274**(1-2): p. 91.
85. Simpson, K.J., et al., *Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach*. Nature Cell Biology, 2008. **10**(9): p. 1027-1038.
86. Mangeot, P.E., et al., *High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors*. Mol Ther, 2002. **5**(3): p. 283-90.
87. Debnath, J., S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge, *Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures*. Methods, 2003. **30**(3): p. 256-68.
88. Filhol, O., et al., *Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II*. Biochemistry, 1991. **30**(46): p. 11133-40.
89. Laramas, M., et al., *Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2alpha) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer*. Eur J Cancer, 2007. **43**(5): p. 928-34.
90. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
91. Yang, Z., et al., *Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions*. Cancer research, 2005. **65**(8): p. 3179.
92. Schlessinger, K. and A. Hall, *GSK-3 sets Snail's pace*. Nature Cell Biology, 2004. **6**(10): p. 913-915.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This research was supported by UJF, INSERM, and la Ligue Nationale contre le cancer, ANR PCV-08. We thank Lionel Larue, Carl Heldin, Joan Massague and Benhua P. Zhou for providing plasmid constructs, Antonio Garcia de Herreros for SNAIL1 Antibody, together with Manuel Thery, Pierre Savagner and Stéphane Ansieau for critical reading of the manuscript and their opinions about results.

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1 : In vitro reconstitution of SNAIL1 phosphorylation by CK2 holoenzyme and GSK3 $\beta$ .**

**(A) SNAIL1 phosphorylation by CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$**  : CK2 $\alpha$  or CK2 $\alpha'$  were incubated during 5 minutes at RT with recombinant MBP-SNAIL1 protein (1 $\mu$ g) and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP/MgCl $_2$ , in the absence or presence of stoichiometric amounts of CK2 $\beta$  regulatory subunit.

**(B) SNAIL1 phosphorylation by CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2 holoenzyme** : CK2 $\alpha$  (14ng = 20nM) and MBP-SNAIL1 (1 $\mu$ g) were incubated during 5 minutes at RT together with radiolabeled [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP/MgCl $_2$  (1nM) and increasing concentrations of CK2 $\beta$  (2.5 - 40nM).

**(C) CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2-dependent priming of SNAIL1 phosphorylation by GSK3 $\beta$**  : MBP-SNAIL1 (1 $\mu$ g) was pre-incubated 30 minutes at RT with unlabeled “cold” ATP in the presence of CK2 $\alpha$  or CK2  $\alpha$ 2 $\beta$ 2 holoenzyme (20nM). Then, CK2 activity was inhibited with Heparin and samples were incubated with or without GSK3 $\beta$  and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP/MgCl $_2$  during 15 minutes at 37°C. Proteins were finally separated by SDS-PAGE ; gels were autoradiographed and coomassie stained to control protein loading.

### **Figure 2 : Phosphorylation of MBP-SNAIL1 and its interaction with CK2 $\alpha$ are modulated by CK2 $\beta$ regulatory subunit in MCF10A epithelial cells.**

**(A) Western Blot analysis of CK2 subunits** in CK2 $\beta$  Knock Down cells ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), “No-target” Knock Down cells (Mock) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with CK2 $\beta$ -HA-tagged insensitive to shRNA $\beta$  ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). Untreated parental MCF10A cells (WT) were used as reference. Lysates were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\beta$  and anti-HA for tagged-exogenous CK2 $\beta$ ).  $\gamma$ -tubulin was used as a loading control.

**(B, C) CK2 kinase activity** in crude lysates from cells described in (A) using two peptidic substrates : either P29 peptide (recording phosphorylation by both CK2 $\alpha$  alone and CK2  $\alpha$ 2 $\beta$ 2 : B) or eIF2 $\beta$ -derived peptide (measuring specific  $\alpha$ 2 $\beta$ 2 holoenzyme activity : C). Samples were assayed in triplicates (representation = mean  $\pm$  SD).

**(D) MBP pull-down:** recombinant MBP-SNAIL1 was incubated with indicated MCF10A cell extracts. Western blot analysis of MBP-SNAIL1 bound proteins was performed with antibodies against CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$  or SNAIL1.

**(E) SNAIL1 phosphorylation by whole cell extracts** : MBP-SNAIL1 was incubated with indicated MCF10A cell extracts in the presence of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP/MgCl $_2$  during 25 minutes at RT. MBP-SNAIL1 was then isolated by affinity chromatography and proteins were separated by SDS-PAGE. The gel was finally Coomassie-stained and autoradiographed.  $\gamma$ -tubulin immunoblotting was used as a loading control.



**Figure 3 : Inhibition of CK2 $\beta$  expression in MCF10A cells triggers SNAIL1 induction.**

**(A) SNAIL1 protein level** in parental MCF10A cells (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), “No-target” Knock Down (Mock) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with CK2 $\beta$ -HA-tagged insensitive to the shRNA ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). WT-cells treated with 2ng/ml TGF $\beta$ 1 (WT+TGF $\beta$ 1) represents a positive control for EMT. Protein extracts were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ ), SNAIL1 or HSP90 (loading control).

**(B) RT-qPCR analysis of SNAIL1 mRNA** in previously described cells. Results were compared to HPRT mRNA levels. WT-MCF10A cells were used as reference and results were normalized to 1 for evaluation of the modulation in the different conditions. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.

**(C) SNAIL1 Promoter activity** : The different MCF10A cells described in (A) were transiently transfected with SNAIL1-promoter/Firefly-luciferase together with HTK-promoter fused to Renilla luciferase (RL-TK). 24 hours post- transfection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly luciferase was normalized to Renilla activity. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.

**Figure 4 : CK2 $\beta$  knockdown induces an EMT-like phenotype in MCF10A cells.**

**(A) Phase contrast pictures** of indicated MCF10A cells : parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with HA-tagged-CK2 $\beta$  insensitive to the shRNA ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). WT-cells treated with 2ng/ml TGF $\beta$ 1 (WT+TGF $\beta$ 1) were used as a positive control for EMT in this model. Magnification = 20X and Scale bar = 10 $\mu$ m.

**(B) Immunofluorescence confocal acquisitions** of MCF10A described in (A) showing actin subcellular localization detected by phalloidin-Alexa 488 (**a, b, c, d** in green) or indirect immunofluorescence using E- or N-cadherin targeting antibodies (**e, f, g, h** and **i, j, k, l** ; respectively, in red). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Magnification = 63X ; Scale bars = 10 $\mu$ m.

**(C) Western Blot analysis of EMT markers and CK2 subunits** in parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), Mock Knock Down (CTRL KD) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with HA-tagged CK2 $\beta$  insensitive to the shRNA ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). TGF $\beta$ 1-treated MCF10A cells. Lysates were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ ), E-cadherin or vimentin.

**(D, E) Evaluation of promoter activities by luciferase reporter assay** : The different MCF10A described in (C) were infected with viral particles encoding either E-cadherin-promoter/Firefly-luciferase (D) or vimentin-promoter/Firefly-luciferase (E) together with HTK-promoter/Renilla-luciferase. 48 hours post infection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly luciferase was normalized to Renilla activity. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.

**Figure 5 : Transcriptomic analysis.**

**(A, B) Microarrays experiments** were performed in triplicate for parental MCF10A cells (WT),  $\Delta$ CK2 $\beta$  ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with HA-tagged-CK2 $\beta$  insensitive to the shRNA ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). WT-cells treated for 48h with 2ng/ml TGF $\beta$ 1 (WT+TGF $\beta$ 1) were used as positive control for EMT. After microarray data processing, transcripts that were significantly modulated upon TGF $\beta$ 1-treatment were extracted and compared to  $\Delta$ CK2 $\beta$  condition. Down-regulated (left panel) and up-regulated (right panel) gene numbers are indicated. For each gene, parental MCF10A cells (white bars) were used as a reference and results were normalized to 1 ( $\Delta$ CK2 $\beta$  = black bars ; TGF $\beta$ 1 = hatched bars and  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$  = grey bars).

**(C) RT-PCR analysis** of indicated mRNA (*CK2 $\beta$* , *SNAIL1*, *SNAIL2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *HPRT*) in equivalent MCF10A cell lines. PCR products were separated on a 1,5% Agarose gel.

**(D) Comparative RT-qPCR analysis** of SNAIL2 mRNA level in previously described cells.

**(E, F, G) Detailed analysis of SNAIL1 specific targets :** mRNA levels of selected Epithelial- (E) and Mesenchymal- (G) related genes were compared. For each gene, parental MCF10A cells (white bars) were used as a reference and results were normalized to 1 ( $\Delta$ CK2 $\beta$  = black bars ; TGF $\beta$ 1 = hatched bars and  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$  = grey bars). Other SNAIL1 target genes linked to Cell-cycle and apoptosis were bioinformatically extracted in the same way (F). Results display triplicate mean values  $\pm$  SD. SNAIL1 known target genes described in [6, 11, 47, 51] that were not amplified or displaying Pvalue > 1% are not represented.

**Figure 6 :  $\Delta$ CK2 $\beta$  induced-EMT is dependent on SNAIL1 Expression.**

**(A, B) RT-qPCR analysis of SNAIL1 and CK2 $\beta$  :** mRNA level in MCF10A cells treated with a lentiviral shRNA against SNAIL1 mRNA ( $\Delta$ SNAIL1 SH1 or SH2) or a random No-target shRNA (Mock). After a first neomycin selection, cells were transduced either with another shRNA targeting CK2 $\beta$  ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) or with the Mock shRNA. Results were compared to HPRT mRNA levels. WT-MCF10A cells were used as reference and triplicate mean value results were calibrated to 1.

**(C) Phase contrast (a, b, c) and Immunofluorescence images** of cadherins subcellular localization in previously described cells using E- or N-cadherin targeting antibodies (**g, h, i** and **j, k, l** ; respectively, in red). Actin was visualized by phalloidin-Alexa488 (**d, e, f**). Magnification = 63X ; Scale bars = 20 $\mu$ m.

**(D, E) Evaluation of promoter activities by luciferase reporter assay :** the different MCF10A cells described in (A) were infected with viral particles encoding either E-cadherin-promoter/Firefly-luciferase (D) or vimentin-promoter/Firefly-luciferase (E) together with HTK-promoter/Renilla-luciferase. 48 hours post infection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly luciferase was normalized to Renilla activity. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.

**(F) Western Blot analysis** of protein lysates from parental MCF10A cells (WT), CK2 $\beta$  Knock Down cells ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) and cells double-transduced with a lentiviral shRNA against SNAIL1 mRNA ( $\Delta$ SNAIL1 SH1 and SH2). Cell lysates were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ ) ; E- and N-cadherins ; cytokeratin 5/6 ; vimentin or HSP90 as loading control.

**(G) CK2 kinase activity :** CK2 and crude MCF10A lysates of cells described in (F) were processed for cellulose-phosphopeptide assay as described in *Materials and Methods* using either eIF2 $\beta$ -derived peptide (left panel) or the P29-peptide (right panel). Error bars represent the SEM of samples assayed in duplicates.

**Figure 7 : SNAIL1 post-translational regulation by multi-phosphorylation.**

**(A) Human SNAIL1 protein amino-acid primary sequence :** The seven conserved residues of the SNAG N-terminal domain are represented in blue and are closed to PKA phosphorylation site (S11). The C-terminal Zinc-Fingers-containing domain (in grey) can be phosphorylated by PAK1. The Serine Rich Domain (SRD : yellow) serves as a platform for several post-translational modifications involving serine/threonine kinases such as CK1, CK2 and GSK3 $\beta$  as well as lysyl-oxydases (LOXL2) and polyubiquitine-ligases ( $\beta$ -TrCP and FBXL14). Because of their proximity to the Nuclear Export Signal (NES : in clear blue), these covalent modifications control both protein stabilization and export from nucleus to cytoplasm.

**(B) Model of SNAIL1 regulation by CK2 tetrameric holoenzyme (CK2  $\alpha$ 2 $\beta$ 2) :** In the present study, we demonstrated that CK2 $\alpha$  phosphorylation of SNAIL1 is mediated by CK2 $\beta$  regulatory subunit. We presume that dynamic assembling of CK2  $\alpha$ 2 $\beta$ 2 holoenzyme cooperates with CK1 to prime subsequent SNAIL1 phosphorylation by GSK3 $\beta$  leading to ubiquitin-mediated SNAIL1 proteasomal degradation. In differentiated epithelial cells, this hierarchical series of covalent modifications ensure low levels of SNAIL1 in order to maintain E-cadherin epithelial prototypic genes (in red). Interestingly, CK2 or GSK3 $\beta$  inhibition leads to a complete EMT-like phenotype in several epithelial cell models (including upregulation of mesenchymal-related genes : in green), suggesting a direct or indirect role for these kinases in SNAIL1 transcriptional regulation (- - -).

**Figure SD-1 : CK2 $\beta$  stable knockdown and rescue in MCF10A cells.**

**(A) CK2 $\beta$  rescue system :** To rule out off-targets effects potentially induced by shRNA treatment, we engineered a double transduction system to generate control cells expressing both a CK2 $\beta$  specific shRNA (targeting the human gene located on chromosome 6) and the pMSCV-neo vector encoding exogenous HA-tagged-chickenCK2 $\beta$  protein, insensitive to the human-targeting sequence. Interestingly, human and chicken homologues display 100% of homology in their respective primary sequence, allowing a full restoration of CK2  $\alpha$ 2 $\beta$ 2 holoenzyme activity.

**(B) Quantification of mRNA levels in MCF10A transduced with shRNA :** Expression levels of the different mRNAs encoding CK2 subunits (CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  and CK2 $\beta$ ) was assessed by comparative RT-qPCR in CK2 $\beta$  Knockdown cells ( $\Delta$ CK2 $\beta$  = black bars), Mock shRNA infected cells (hatched bars) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with chicken-CK2 $\beta$  ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$  = grey bars). For each CK2 subunit, WT-MCF10A cells (white bars) were used as a reference and means of triplicate results were calibrated to HPRT mRNA level and normalized to 1.

**(C) Western blot analysis of CK2 subunits in equivalent MCF10A cell lines.** Lysates were immunoblotted with antibodies against CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  or CK2 $\beta$  ;  $\gamma$ -ubulin was used as loading control.

**Figure SD-2 : CK2 unbalanced expression by siRNA induces an EMT-like phenotype.**

**(A) Quantification of mRNA levels** in MCF10A transiently treated with siRNA against CK2 subunits (CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  and CK2 $\beta$ ). mRNA expression levels of the different targeted CK2 subunits were tested by comparative RT-qPCR in MCF10A cells untreated (WT) or treated with indicated siRNA for 72h. For each CK2 subunit, HPRT was used as calibrator and GFP-siRNA-treated MCF10A cells were used as the reference and results were normalized to 1.

**(B) Western blot analysis of CK2 subunits** in MCF10A cells untreated (WT) or treated with indicated siRNA for 72h. Cell lysates were then immunoblotted with antibodies against CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  and CK2 $\beta$  ; detection of  $\gamma$ -tubulin was used as loading control.

**(C) CK2 kinase activity** in each crude lysate of cells previously described in (B) was measured as indicated in *Materials and Methods* using two substrates : either P29-peptide (left panel) or eIF2 $\beta$ -derived peptide (right panel).

**(D) Actin staining** using Phalloidin in MCF10A transiently treated with siRNA against CK2 subunits (CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  and CK2 $\beta$ ) or control GFP siRNA. Mock cells were treated with lipofectamine 2000 alone. After 72h, cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Magnification = 20X ; Scale bars = 20 $\mu$ m.

**(E) Immunofluorescence images** of previously described cells, showing E-cadherin subcellular localization detected by indirect immunofluorescence using anti-E-cadherin targeting antibody (in red). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Confocal images with a 63X magnification (bars = 20 $\mu$ m).

**(F, G) Evaluation of promoter Activities by luciferase reporter assay** : The different MCF10A described in (D) were infected with viral particles encoding either E-Cadherin-promoter/Firefly-Luciferase (F) or vimentin-promoter/Firefly-luciferase (G) together with HTK-promoter/Renilla-luciferase. 48 hours post infection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly was normalized to Renilla activity.

**(H) Comparative RT-qPCR** was performed using primers selectively amplifying SNAIL1 human mRNA vs HPRT. WT- MCF10A cells were used as the reference and normalized to 1. Results are represented as mean values  $\pm$  SD.

**Figure SD-3 : CK2 $\beta$  knockdown induces an EMT-like phenotype in HaCaT cells.**

**(A) Immunofluorescence images** of E- and N-cadherin expression (in red) in human HaCaT keratinocytes Parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), and cells infected with a non-target lentiviral shRNA (Mock). WT-cells treated with 2ng/ml TGF $\beta$ 1 were used as positive control for EMT (WT+TGF $\beta$ 1). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Magnification = 63X, Bars = 20 $\mu$ m.

**(B) RT-qPCR analysis** of CK2 $\beta$  regulatory subunit, E-cadherin and vimentin in human HaCaT keratinocytes, parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) and cells infected with a non-target lentiviral shRNA (Mock). The expression level of the different mRNAs was compared by comparative RT-qPCR to HPRT mRNA. MCF10A cells were used as the reference and normalized to 1 to evaluate the modulation in the different conditions.

## **TABLES**

**Table 1 : pLKO.1 lentiviral shRNA.**

**Table 2 : qPCR Primers and siRNA.**

**Table XD : Directed Mutagenesis Primers.**

## C. Résultats complémentaires (Extra Data)

### **COMPLEMENTARY FIGURE LEGENDS (XD-1 to XD-4)**

#### **Figure XD-1 : SNAIL1 SRD mutagenesis based on NetPhosK prediction.**

(A) **NetPhosK prediction of CK2 phosphosites** : In the Serine Rich Domain, five consensus motifs were found to exhibit a score upper than 0,50 (probability of phosphorylation upper than 50%) : **T<sup>89</sup>**, **S<sup>90</sup>** and **S<sup>92</sup>** form a N-terminal S/T cluster (NS) and **S<sup>119</sup>** and **S<sup>120</sup>** constitute a second motif located at the end of the SRD that we called C-terminal S cluster (CS). Moreover, this profile displays relative high scores for CK2 phosphorylation of residues **S<sup>20</sup>** and **S<sup>25</sup>**.

- *SNAIL1 Protein Access Number (Homo Sapiens) : NP\_005976.2*

- *NetPhosK 1.0 Server : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/> (Expasy tools)*

(B) **SNAIL1 phosphorylation** : The Serine Rich Domain (SRD : yellow) is phosphorylated on many different residues by CK1, CK2 and GSK3 $\beta$ . Several other covalent modifications (Lysyl oxydation, ubiquitination...) can occur along the entire protein sequence (upper panel). Based on NetPhosK prediction CK2 should recognize two serines together with one threonine in the SRD N-terminal cluster and two serines into the C-terminal cluster. All these residues are tightly closed from previously identified GSK3 $\beta$  phosphosites (clusters 2S and 4S) that control both protein stabilization and export from nucleus to cytoplasm [38].

(C) **Directed mutagenesis of SNAIL1 SRD** : N-terminal and C-terminal cluster were mutated separately or together using Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and specific primers (table XD-3). S/A mutagenesis (NSA, CSA and NCSA) is design to abolish theoretical CK2 phosphorylation. On the contrary, S/E mutations (NSE, CSE and NCSE) are supposed to mimic a constitutive phosphorylation of serines and threonines (pseudo-phosphorylation).

#### **Figure XD-2 : Cooperation of CK2 and GSK3 in SNAIL1 phosphorylation and destabilization.**

(A) **SNAIL1 phosphorylation by CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2 holoenzyme** : stoichiometric amounts of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  were incubated during 5 minutes at RT with WT-MBP-SNAIL1 (1 $\mu$ g) or with the different S/A mutants in the presence of radiolabeled [ $\gamma$ -32P]-ATP/MgCl<sub>2</sub> (left panel). In a second experiment, S/E pseudo-phosphorylated mutants for either GSK3 $\beta$  or CK2 phosphosites (respectively 4SE and NCSE) were incubated with recombinant CK2 $\alpha$ 2 $\beta$ 2 or GSK3 $\beta$ , respectively (right panel). Phosphorylation levels were compared to those obtained with WT-SNAIL1 protein in the same experimental conditions and Coomassie staining was used as a loading control.

**(B) Western blot analysis of SNAIL1 mutants :** HA-tagged human SNAIL1 variants under CMV promoter control were transfected into human HEK293 and murine NMuMG cells. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against Influenza Hemagglutinin (HA) and HSP90 that was used as a loading control.

**Figure XD-3 : Modelisation of SRD phosphorylation influence on SNAIL1 N-terminal-half folding.**

Primary sequence of WT-SNAIL1 and pseudo-phosphorylated S/E mutants were submitted to LOMETS server from Zhang lab (Expasy tools : <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/LOMETS/>). Models with the highest predictive scores were selected and analysed using PDB 3D molecule viewer (Invitrogen) ; serines and threonines replaced by glutamic acid residues are marked in yellow.

**Figure XD-4 : SNAIL1 transcriptional activity is cell-type dependent.**

**(A, B) Evaluation of SNAIL1 promoter activity** in NMuMG and MCF10A cells transfected with pSNAIL1/Firefly-luciferase reporter constructs and RL-TK calibrator. Luciferase activity was measured after 24h ; cells were eventually treated during 12h with TGF $\beta$ 1 and EGF. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.

**(C) CDH1 repression** in MCF10A cells that were transiently infected with lentiviral particles encoding E-cadherin-promoter/Firefly luciferase (D) with RL-TK calibrator. Bioluminescence was evaluated 48 hours post infection.

**(D, E) SNAIL1 promoter activity** in MDA-MB231 or HEK293 cell lines transfected with pSNAIL1/Firefly-luciferase reporter constructs and RL-TK calibrator. Luciferase activity was measured as described in (A, B).



## **COMPLEMENTARY RESULTS (Extra-Data XD-1 to XD-4)**

### **Multisite-directed mutagenesis of CK2 and GSK3 $\beta$ phosphosites on SNAIL1 Serine Rich Domain.**

A detailed analysis of human SNAIL1 primary sequence (NP\_005976) reveals that on 264 residues, we can find 33 serines (12,5%), 10 threonines and 6 tyrosines. Such a configuration can allow more than 2401 different combinations of non-modified and phosphorylated residues, constituting a potential post-translational code for interaction with diverse partners, including ubiquitin-specific ligases and proteases as well as cell transporters and co-regulators. To date, five different kinases have been found to be able to phosphorylate ten of these amino-acids [3-4, 30-31, 35, 91] (figure XD-1B). A prediction of SNAIL1 theoretical phosphosites using NetPhosK 2.1 server shows that most of these residues are predicted to be phosphorylated by at least one kinase with a probability upper than 50% (figure XD-1A and C). We found seven residues potentially recognized by CK2 and five of them were located into the Serine Rich Domain. Interestingly, these consensus motives also harbored relative high scores for recognition by CK1 and/or GSK3 $\beta$  suggesting that some of them can be regulated by several different kinases.

To get deeper insight in SNAIL1 behaviour upon CK2 phosphorylation, we used a multi-site directed mutagenesis approach based on data obtained from NetPhosK analysis. Into the SRD, we defined two different clusters containing a total of five residues that exhibited a predictive score higher than  $P=0,5$  (figure XD-1A). One threonine and two serines compose the N-terminal cluster (NS : T<sup>89</sup>, S<sup>90</sup> and S<sup>92</sup>) whereas the C-terminal cluster is made of only two serines (CS : S<sup>119</sup> and S<sup>120</sup>). Site-directed mutations were generated for both clusters by S/T-to-A (Alanine) or S/T-to E (Glutamic acid) substitutions and a double mutant called NCS was also engineered (figure XD-1C and Table XD).

*In vitro*, the phosphorylation of SNAIL1 by CK2  $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme was strongly affected in NSA mutant (T89A/S90A/S92A) whereas integration of radiolabeled  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP was similar between CSA mutant (S119A/S120A) and WT protein. Surprisingly, S<sup>119</sup> exhibited the highest predictive score and phosphorylation of full NCSA mutant was slightly weaker than the one of NSA, suggesting that the C-terminal cluster could also contribute to SNAIL1 phosphorylation *in vitro* (figure XD-2A, left panel) In a second time, we used “pseudo-phosphorylated” mutants (S/T to E) to examine the cooperation between GSK3 $\beta$  and CK2 in the phosphorylation of SNAIL1 protein (Millipore). As expected, NCSE full mutant was better phosphorylated by human purified GSK3 $\beta$  compared to WT protein that was very low in our experiments. Interestingly, the previously described mutant 4SE from B.P. Zhou (S104E, S107E, S111E, S115E) [30] was also found to better integrate radioactive phosphate when incubated with CK2 holoenzyme. Taken together, these data indicate that CK2 and GSK3 $\beta$  can prime each other to ensure SNAIL1 maximal phosphorylation. Given the importance of GSK3 $\beta$  phosphorylation in the regulation of SNAIL1 protein stability, we next investigated NCSA and NCSE expression levels in different cell lines. Figure XD-2B shows that compared to WT SNAIL1, the protein level of both CK2 and GSK3 $\beta$  S/A mutants (NCSA and 6SA) were particularly stabilized in HEK293 human cells whereas differences were limited in NMuMG

cells. Conversely, transfected NCSE and 4SE were found to be less expressed in both cellular models suggesting that pseudo-phosphorylation serines targeted by either CK2 or GSK3 $\beta$  leads to enhanced lysine polyubiquitination and transport to proteasome.

Another presumed role of SRD phosphorylation is the influence that such a gain of acidic residues might have on the structural (and probably functional) folding of SNAIL1 protein. In the absence of crystal structure for any member of the SNAIL superfamily, we used LOMETS server 3D-predictive modelisation to investigate potential differences between wild type SNAIL1 protein and S/E pseudo-phosphorylated mutants. Figure XD-3 shows that acidic substitution of serine residues predicted to be targeted by either GSK3 $\beta$  or CK2 tend to promote unfolding of both the Serine Rich Domain and the adjacent Nuclear Export Signal (NLS). Moreover, when the substitution was done in the phosphosite clusters of the two kinases, the entire C-terminal half was more open compared to WT-SNAIL1 model. Although these predictive structures are probably far from the real *in vivo* 3D conformation of SNAIL1 proteins, they strongly suggest that phosphorylation of the SRD might not only trigger the binding of ubiquitin-specific ligases such as  $\beta$ -TrCP but could also generate conformational changes affecting NLS recognition and transcriptional activity. Altogether, these data sustain a possible cooperative mechanism between CK2 and GSK3 $\beta$  in the complex regulation of SNAIL1 central domain. Previous studies have suggested a model where SRD phosphorylation could affect SNAIL1 turn-over as well as its subcellular localization and its repressor activity [70, 92]. In agreement with these findings, we demonstrate that acidification of SNAIL1 SRD by these two serine/threonine kinases have important consequences on protein destabilization probably in relation with major conformational changes. Importantly, at 18h and 24h post-transfection, we failed to notice any difference in subcellular localization between the different mutants using both immunofluorescence and cell fractionation in MDA-MB231, HEK293, MCF10A and NMuMG cell lines (data not shown).

### **SNAIL1 promoter auto-regulation is cellular context-dependent.**

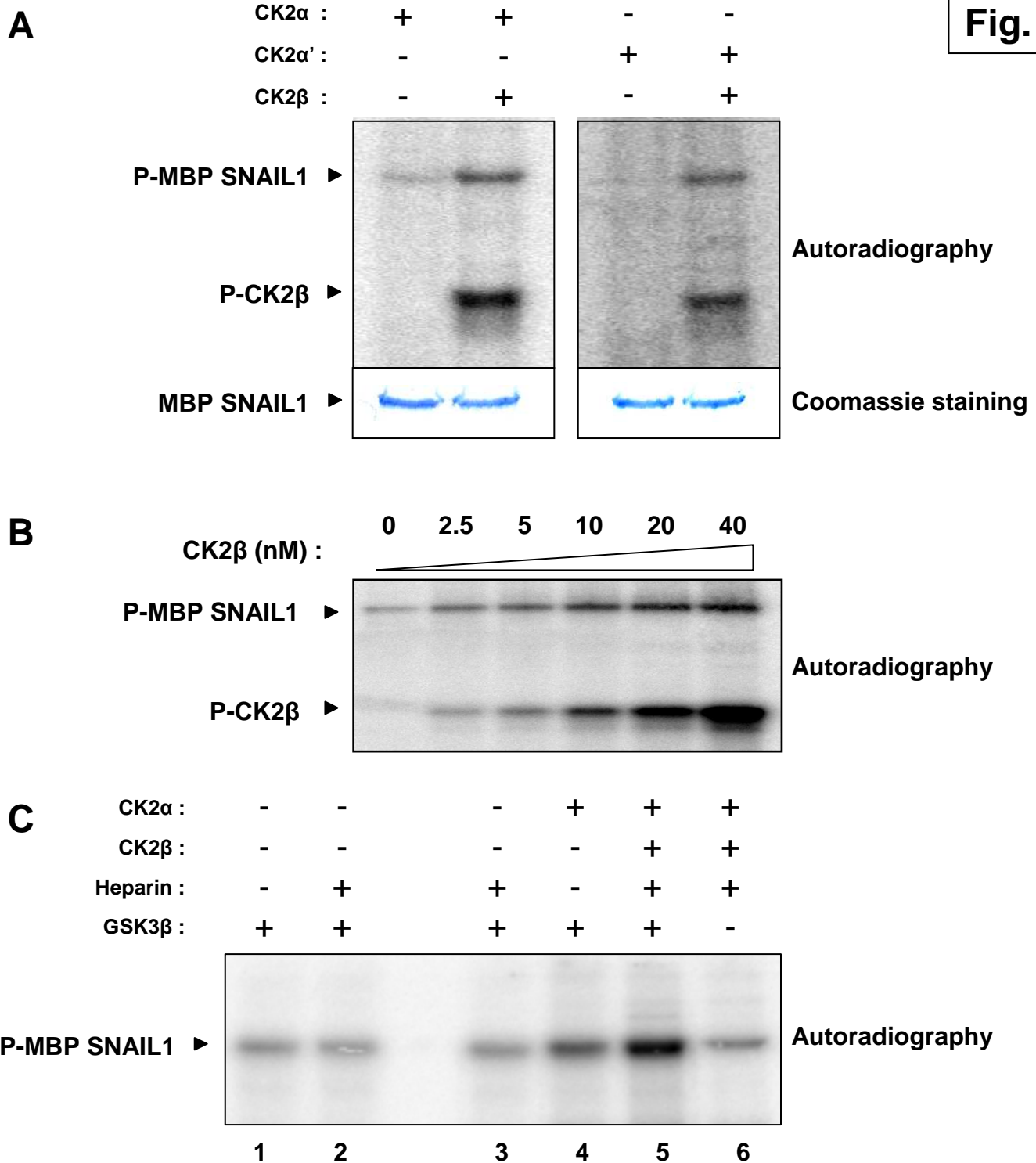
In cohesive epithelial cells, SNAIL1 transcription is tightly controlled in order to maintain E-cadherin expression and this protein is able to represses its own transcription through the reconnaissance of a E-box motif contained in its promoter [55]. Conversely, SNAIL2 that also binds E-boxes is self-activated in avian neural crest [56], suggesting that SNAIL factors can eventually switch from repressor to activator functions. Recently, emerging data provided evidence that ectopic SNAIL1 could increase its synthesis by itself depending on the presence or absence of E-cadherin into the plasmic membrane and probably on the nuclear amount of NF- $\kappa$ B and/or  $\beta$ -catenin factors [3]. To investigate SNAIL1 auto-regulation in the different cell lines we used in this study, we transfected SNAIL1-promoter fused to Firefly luciferase[38], together with HA-tagged SNAIL1 human protein under pCMV control. In these experiments, although luciferase activity was slightly weaker when SNAIL1 was artificially upregulated in cohesive epithelial cells such as NMuMG and MCF10A cells, we could also observe a positive auto-regulation when cells were induced to EMT using EGF and TGF $\beta$ 1 (figure SD-4A and B). At contrary, SNAIL1 triggered E-cadherin repression in both untreated and stimulated cells (figure SD-4C). Interestingly, this activation feedback loop was also observed in MDA-B231 and HEK293 that express low E-cadherin levels (D and E), indicating that SNAIL1 can decrease or enhance its own synthesis dependently on the cellular context.

Therefore, we can presume that such differences might be explained by heterogeneous levels of some eventual co-regulators that have the ability to modulate SNAIL1 transcriptional repressor activity in the different cells lines. Given the importance of SNAIL1 association with  $\beta$ -catenin or NF- $\kappa$ B factor, it would be attractive to further explore how these proteins take part in the switch from auto-repression loops to self-synthesis activation.

## *Figure Data*



**Fig. 1**

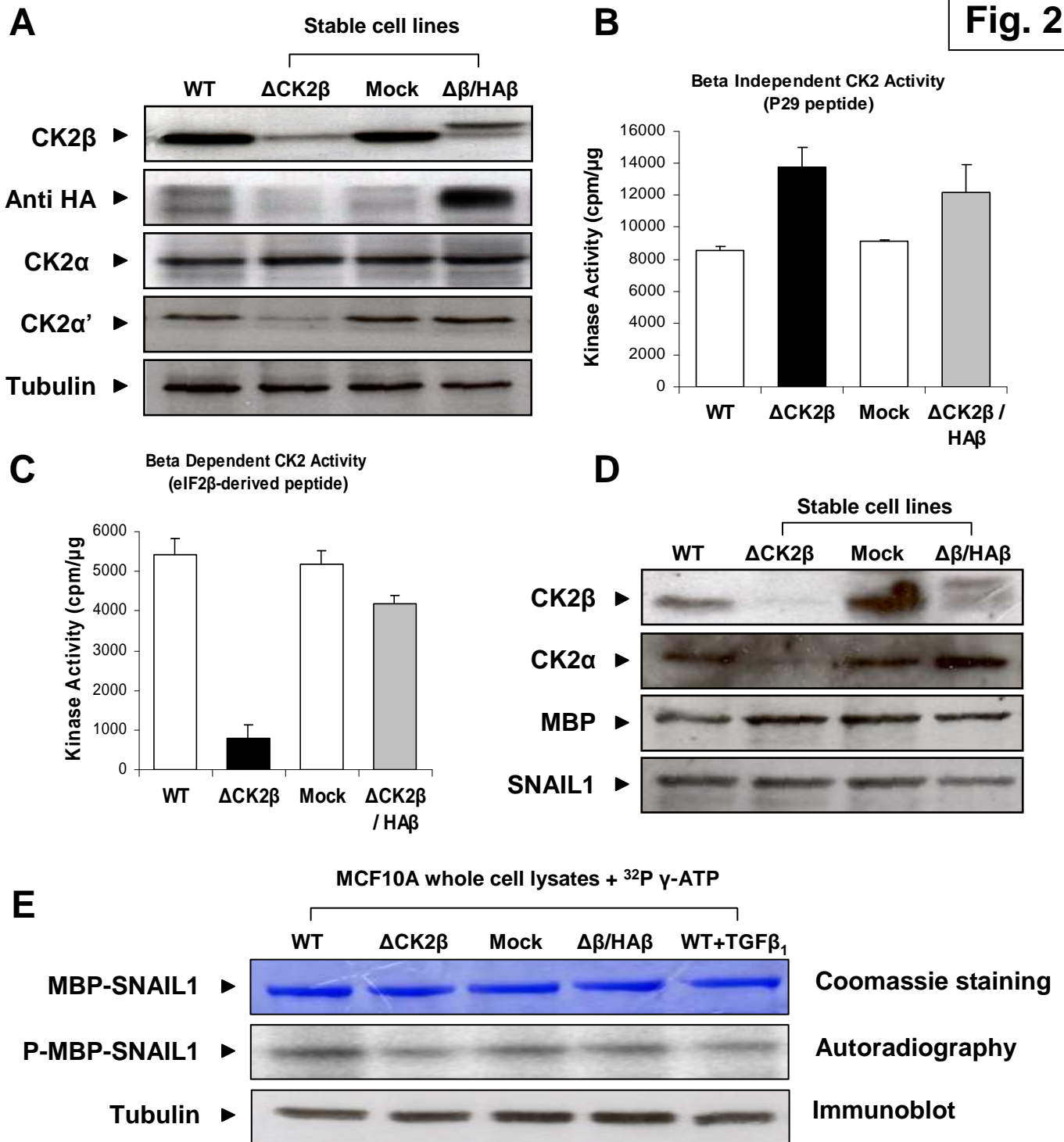


**Figure 1 : *In vitro* reconstitution of SNAIL1 phosphorylation by CK2 holoenzyme and GSK3 $\beta$ .**

**(A) SNAIL1 phosphorylation by CK2 $\alpha$  and CK2 $\alpha'$  :** CK2 $\alpha$  or CK2 $\alpha'$  were incubated during 5 minutes at RT with recombinant MBP-SNAIL1 protein (1 $\mu$ g) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP/MgCl<sub>2</sub>, in the absence or presence of stoichiometric amounts of CK2 $\beta$  regulatory subunit.

**(B) SNAIL1 phosphorylation by CK2 $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme :** CK2 $\alpha$  (14ng = 20nM) and MBP-SNAIL1 (1 $\mu$ g) were incubated during 5 minutes at RT together with radiolabeled [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP/MgCl<sub>2</sub> (1nM) and increasing concentrations of CK2 $\beta$  (2.5 - 40nM).

**(C) CK2 $\alpha_2\beta_2$ -dependent priming of SNAIL1 phosphorylation by GSK3 $\beta$  :** MBP-SNAIL1 (1 $\mu$ g) was pre-incubated 30 minutes at RT with unlabeled "cold" ATP in the presence of CK2 $\alpha$  or CK2  $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme (20nM). Then, CK2 activity was inhibited with Heparin and samples were incubated with or without GSK3 $\beta$  and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP/MgCl<sub>2</sub> during 15 minutes at 37°C. Proteins were finally separated by SDS-PAGE ; gels were autoradiographed and coomassie stained to control protein loading.

**Fig. 2**

**Figure 2 : Phosphorylation of MBP-SNAIL1 and its interaction with CK2 $\alpha$  are modulated by CK2 $\beta$  regulatory subunit in MCF10A epithelial cells.**

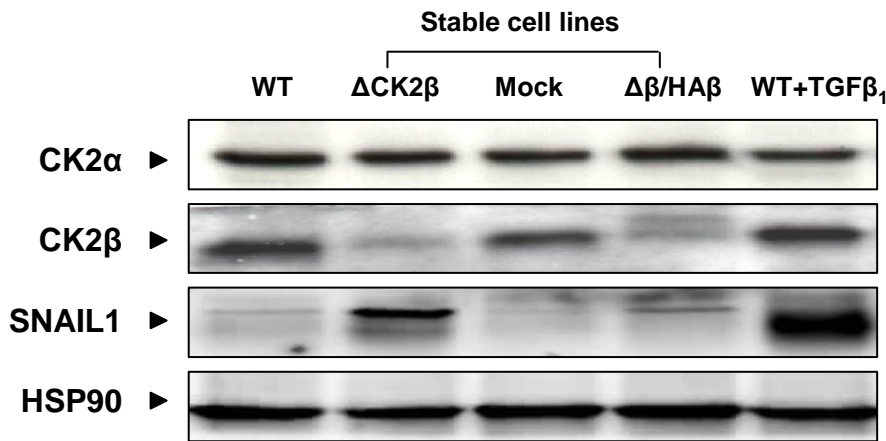
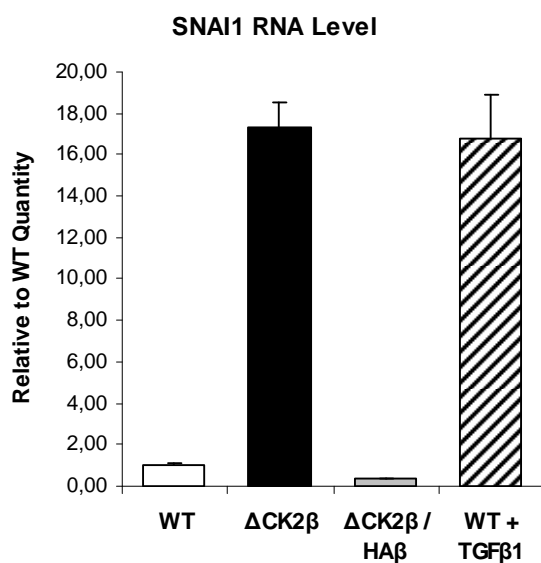
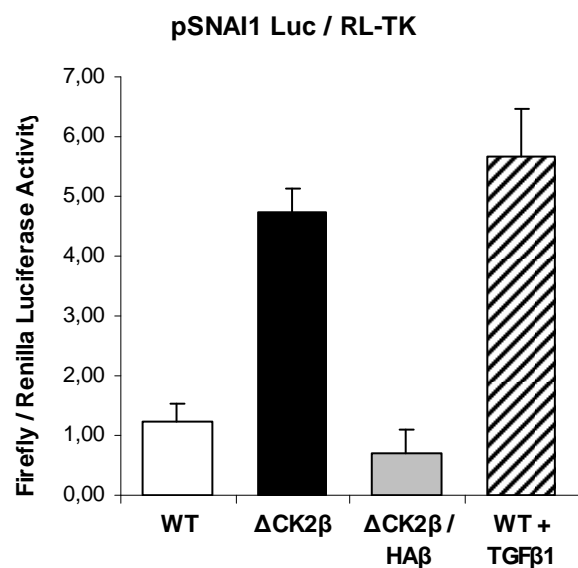
**(A) Western Blot analysis of CK2 subunits** in CK2 $\beta$  Knock Down cells ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), “No-target” Knock Down cells (Mock) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with CK2 $\beta$ -HA-tagged insensitive to shRNA $\beta$  ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). Untreated parental MCF10A cells (WT) were used as reference. Lysates were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$ , CK2 $\beta$  and anti-HA for tagged-exogenous CK2 $\beta$ ).  $\gamma$ -tubulin was used as a loading control.

**(B, C) CK2 kinase activity** in crude lysates from cells described in (A) using two peptidic substrates : either P29 peptide (recording phosphorylation by both CK2 $\alpha$  alone and CK2  $\alpha_2\beta_2$  : B) or eIF2 $\beta$ -derived peptide (measuring specific  $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme activity : C). Samples were assayed in triplicates (representation = mean  $\pm$  SD).

**(D) MBP pull-down:** recombinant MBP-SNAIL1 was incubated with indicated MCF10A cell extracts. Western blot analysis of MBP-SNAIL1 bound proteins was performed with antibodies against CK2 $\alpha$ , CK2 $\beta$  or SNAIL1.

**(E) SNAIL1 phosphorylation by whole cell extracts :** MBP-SNAIL1 was incubated with indicated MCF10A cell extracts in the presence of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP/MgCl $_2$  during 25 minutes at RT. MBP-SNAIL1 was then isolated by affinity chromatography and proteins were separated by SDS-PAGE. The gel was finally Coomassie-stained and autoradiographed.  $\gamma$ -tubulin immunoblotting was used as a loading control.

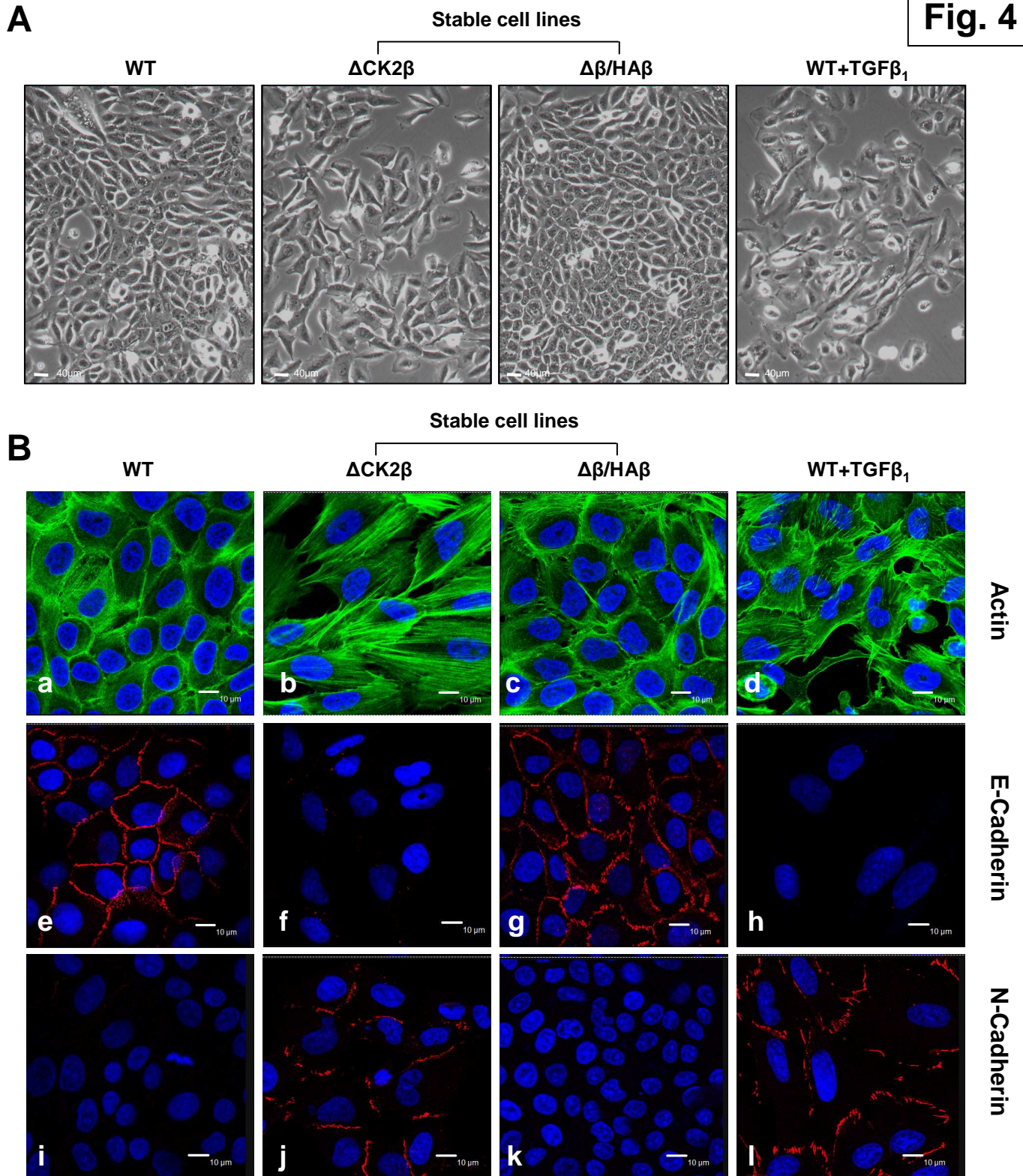


**Fig. 3****A****B****C****Figure 3 : Inhibition of CK2 $\beta$  expression in MCF10A cells triggers SNAIL1 induction.**

**(A) SNAIL1 protein level** in parental MCF10A cells (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), “No-target” Knock Down (Mock) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with CK2 $\beta$ -HA-tagged insensitive to the shRNA ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). WT-cells treated with 2ng/ml TGF $\beta_1$  (WT+TGF $\beta_1$ ) represents a positive control for EMT. Protein extracts were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ ), SNAIL1 or HSP90 (loading control).

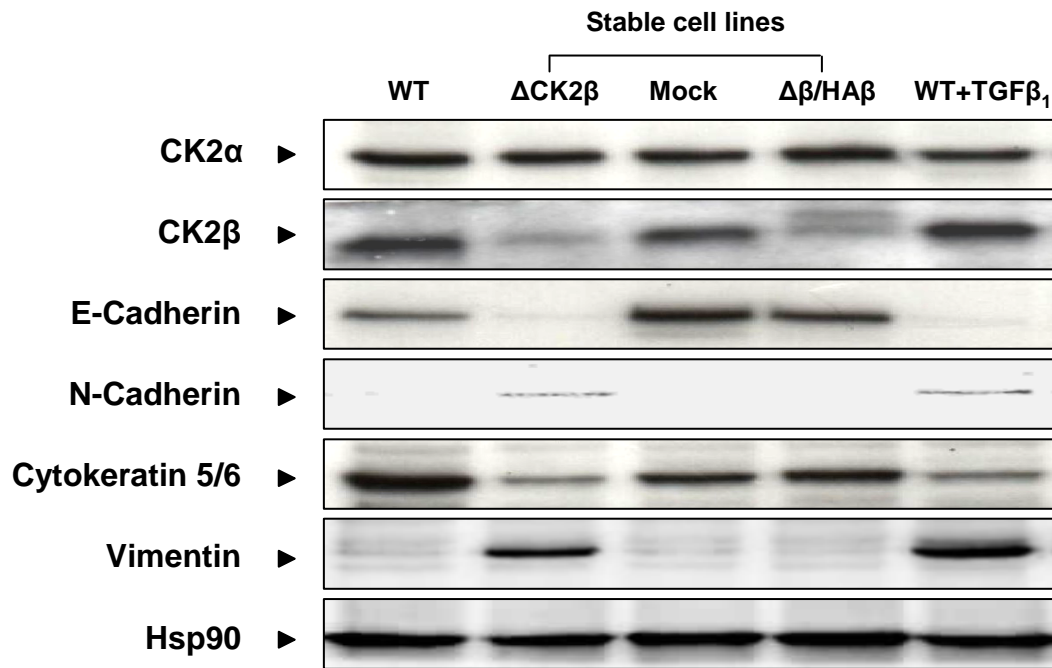
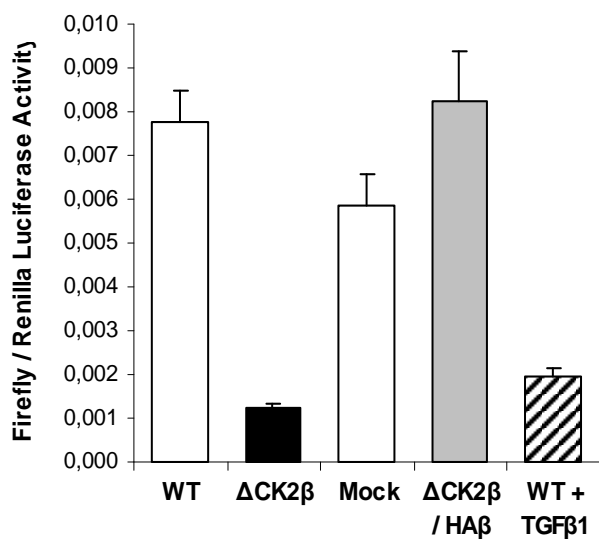
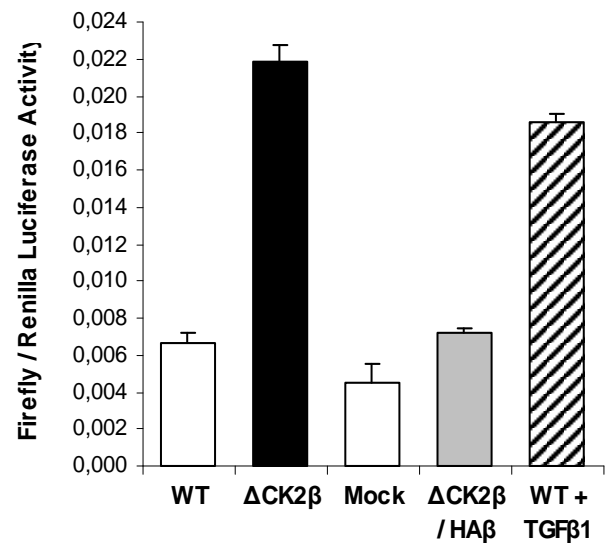
**(B) RT-qPCR analysis of SNAIL1 mRNA** in previously described cells. Results were compared to HPRT mRNA levels. WT-MCF10A cells were used as reference and results were normalized to 1 for evaluation of the modulation in the different conditions. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.

**(C) SNAIL1 Promoter activity** : The different MCF10A cells described in (A) were transiently transfected with SNAIL1-promoter/Firefly-luciferase together with HTK-promoter fused to Renilla luciferase (RL-TK). 24 hours post-transfection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly luciferase was normalized to Renilla activity. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.

**Fig. 4****Figure 4 : CK2 $\beta$  knockdown induces an EMT-like phenotype in MCF10A cells.**

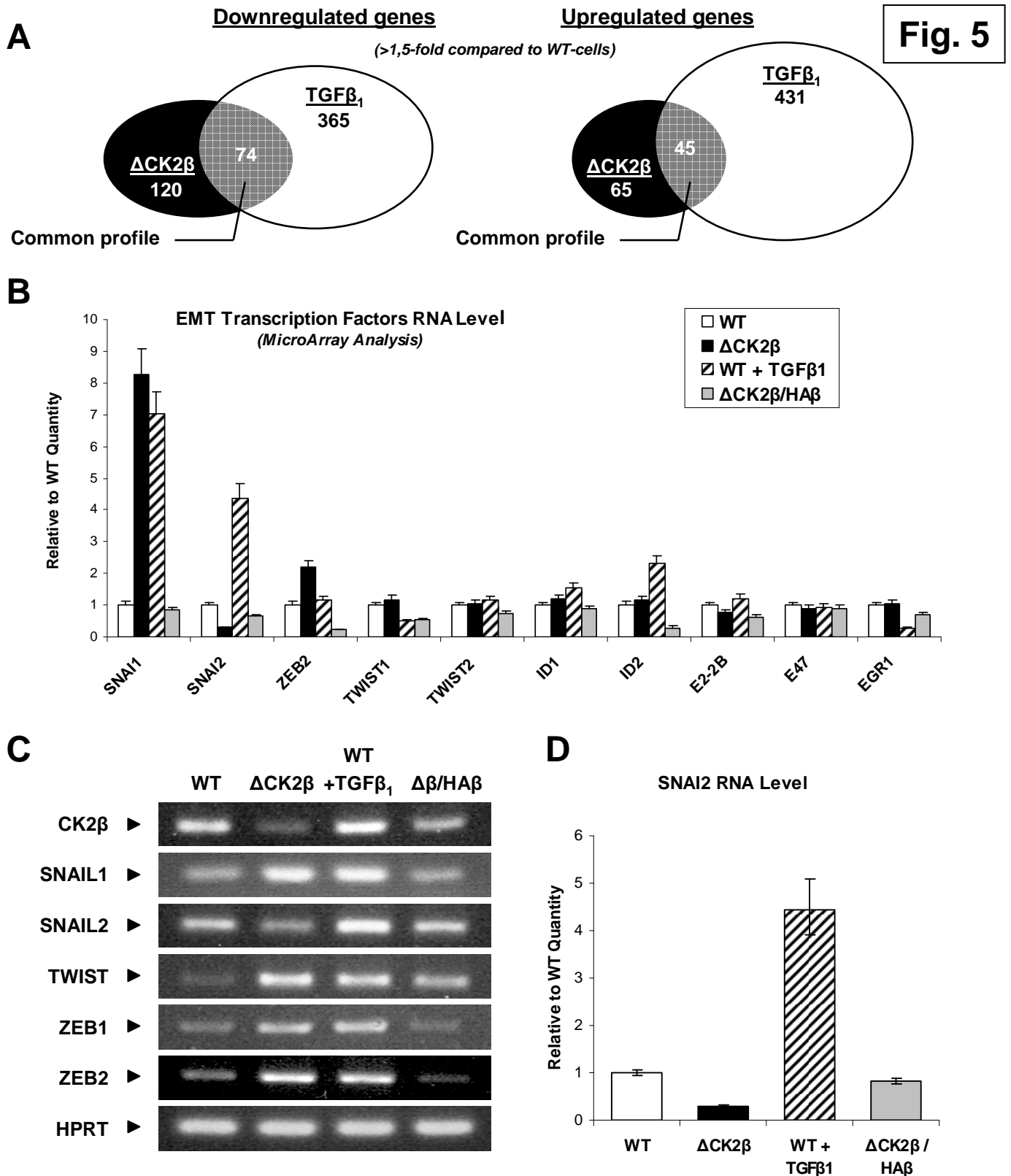
**(A) Phase contrast pictures** of indicated MCF10A cells : parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with HA-tagged-CK2 $\beta$  insensitive to the shRNA ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). WT-cells treated with 2ng/ml TGF $\beta_1$  (WT+TGF $\beta_1$ ) were used as a positive control for EMT in this model. Magnification = 10X and Scale bars = 40 $\mu$ m.

**(B) Immunofluorescence confocal acquisitions** of MCF10A described in (A) showing actin subcellular localization detected by phalloidin-Alexa 488 (a, b, c, d in green) or indirect immunofluorescence using E- or N-cadherin targeting antibodies (e, f, g, h and i, j, k, l ; respectively, in red). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Magnification = 63X ; Scale bars = 10 $\mu$ m.

**Fig. 4****C****D****pE-Cadherin / RL-TK****E****pVimentin / RL-TK****Figure 4 : CK2 $\beta$  knockdown induces an EMT-like phenotype in MCF10A cells.**

**(C) Western Blot analysis of EMT markers and CK2 subunits** in parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), Mock Knock Down (CTRL KD) and  $\Delta$ CK2 $\beta$  cells rescued with HA-tagged CK2 $\beta$  insensitive to the shRNA ( $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$ ). TGF $\beta_1$ -treated MCF10A cells. Lysates were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ ), E-cadherin or vimentin.

**(D, E) Evaluation of promoter activities by luciferase reporter assay :** The different MCF10A described in (C) were infected with viral particles encoding either E-cadherin-promoter/Firefly-luciferase (D) or vimentin-promoter/Firefly-luciferase (E) together with HTK-promoter/Renilla-luciferase. 48 hours post infection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly luciferase was normalized to Renilla activity. Results are represented as triplicate mean values  $\pm$  SD.



**Figure 5 : Transcriptomic analysis.**

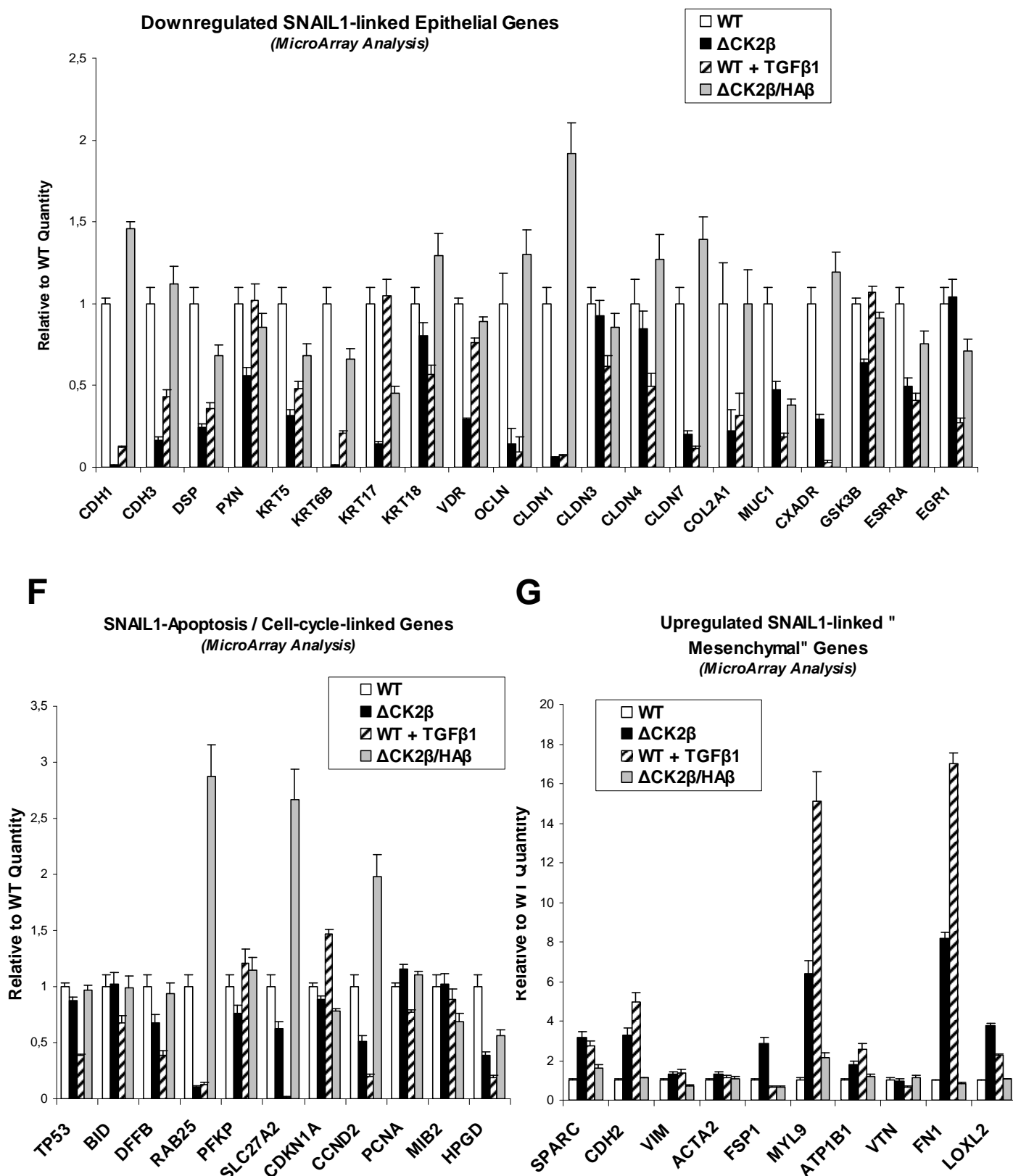
**(A, B) Microarrays experiments** were performed in triplicate for parental MCF10A cells (WT),  $\Delta CK2\beta$ - ( $\Delta CK2\beta$ ) and  $\Delta CK2\beta$  cells rescued with HA-tagged-CK2 $\beta$  insensitive to the shRNA ( $\Delta CK2\beta/HA\beta$ ). WT-cells treated for 48h with 2ng/ml  $TGF\beta_1$  (WT+ $TGF\beta_1$ ) were used as positive control for EMT. After microarray data processing, transcripts that were significantly modulated upon  $TGF\beta_1$ -treatment were extracted and compared to  $\Delta CK2\beta$  condition. Down-regulated (left panel) and up-regulated (right panel) gene numbers are indicated. For each gene, parental MCF10A cells (white bars) were used as a reference and results were normalized to 1 ( $\Delta CK2\beta$  = black bars ;  $TGF\beta_1$  = hatched bars and  $\Delta CK2\beta/HA\beta$  = grey bars).

**(C) RT-PCR analysis** of indicated mRNA (CK2 $\beta$ , SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1, ZEB2, HPRT) in equivalent MCF10A cell lines. PCR products were separated on a 1,5% Agarose gel.

**(D) Comparative RT-qPCR analysis** of SNAI2 mRNA level in previously described cells.



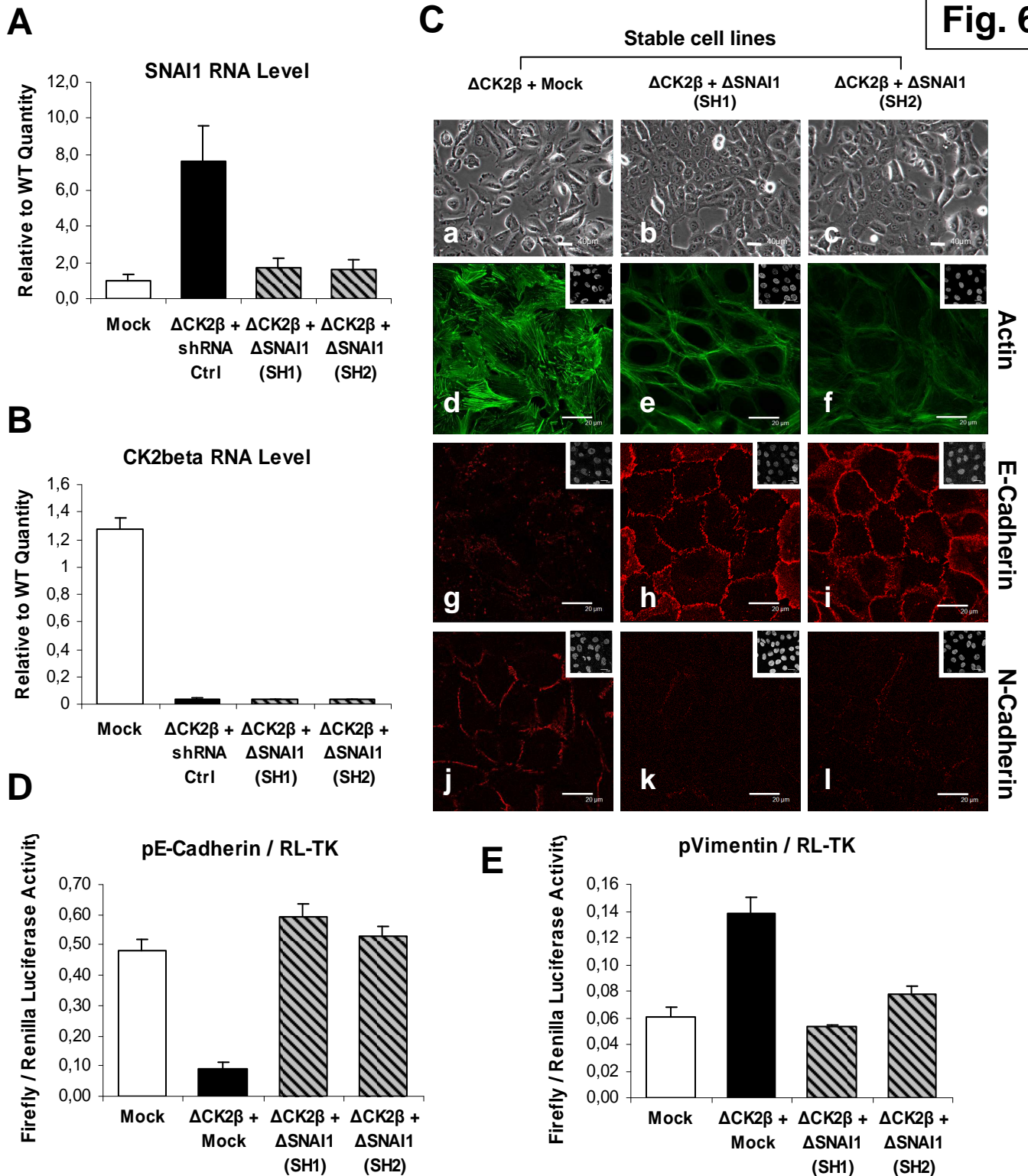
**Fig. 5**



**Figure 5 : Transcriptomic analysis.**

**(E, F, G) Detailed analysis of SNAIL1 specific targets :** mRNA levels of selected Epithelial- (E) and Mesenchymal- (G) related genes were compared. For each gene, parental MCF10A cells (white bars) were used as a reference and results were normalized to 1 ( $\Delta$ CK2 $\beta$  = black bars ; TGF $\beta$ <sub>1</sub> = hatched bars and  $\Delta$ CK2 $\beta$ /HA $\beta$  = grey bars). Other SNAIL1 target genes linked to Cell-cycle and apoptosis were bioinformatically extracted in the same way (F). Results display triplicate mean values  $\pm$  SD. SNAIL1 known target genes described in [6, 11, 47, 51] that were not amplified or displaying Pvalue > 1% are not represented.

**Fig. 6**

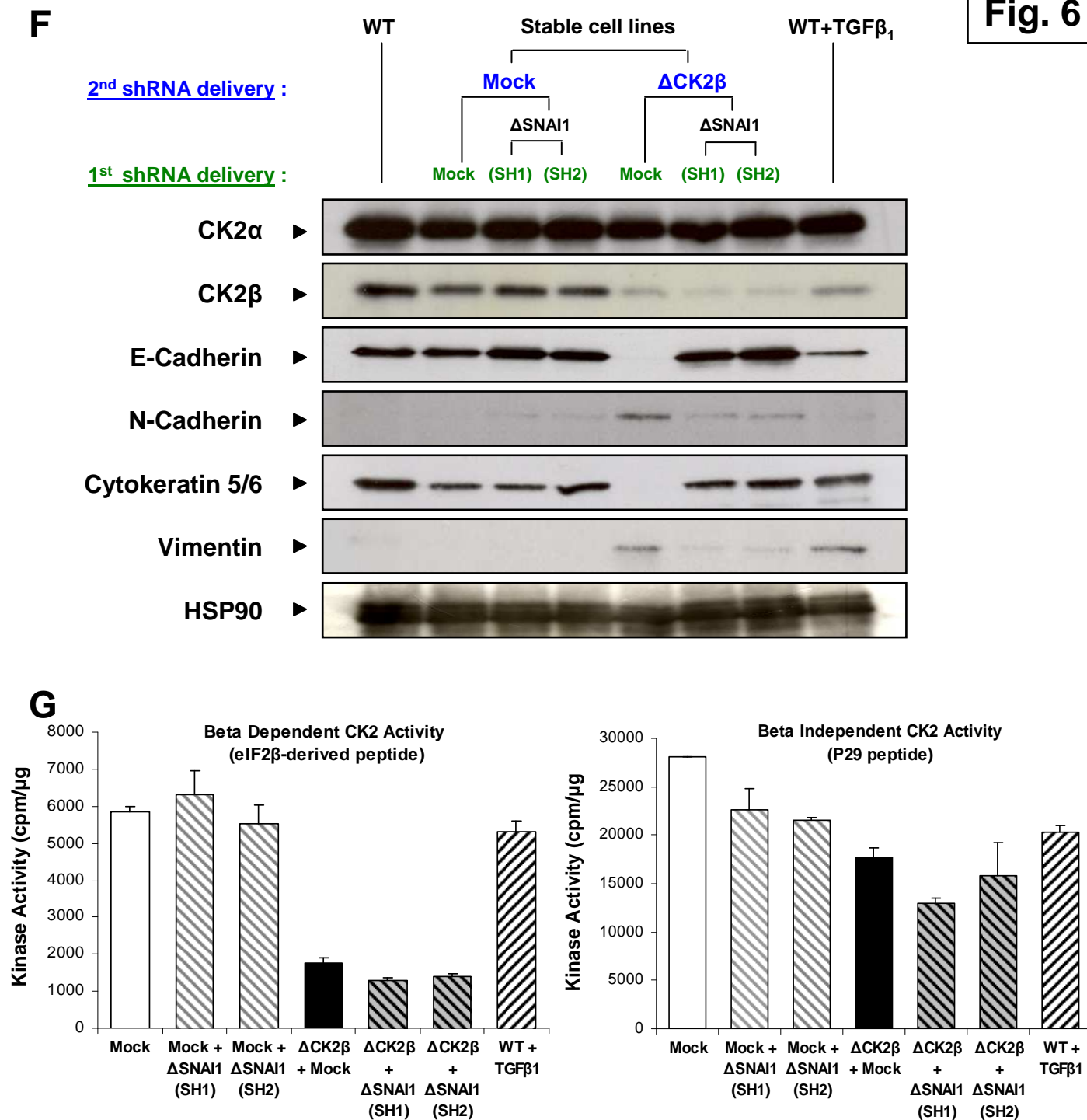


**Figure 6 : ΔCK2β induced-EMT is dependent on SNAIL1 Expression.**

**(A, B) RT-qPCR analysis of SNAIL1 and CK2β** : mRNA level in MCF10A cells treated with a lentiviral shRNA against SNAIL1 mRNA (ΔSNAIL1 SH1 or SH2) or a random No-target shRNA (Mock). After a first neomycin selection, cells were transduced either with another shRNA targeting CK2β (ΔCK2β) or with the Mock shRNA. Results were compared to HPRT mRNA levels. WT-MCF10A cells were used as reference and triplicate mea, value results were calibrated to 1.

**(C) Phase contrast (a, b, c) and Immunofluorescence images** of cadherins subcellular localization in previously described cells using E- or N-cadherin targeting antibodies (g, h, i and j, k, l ; respectively, in red). Actin was visualized by phalloidin-Alexa488 (d, e, f). Magnification = 63X ; Scale bars = 20μm.

**(D, E) Evaluation of promoter activities by luciferase reporter assay** : the different MCF10A cells described in (A) were infected with viral particles encoding either E-cadherin-promoter/Firefly-luciferase (D) or vimentin-promoter/Firefly-luciferase (E) together with HTK-promoter/Renilla-luciferase. 48 hours post infection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly luciferase was normalized to Renilla activity. Results are represented as triplicate mean values ± SD.

**Fig. 6****Figure 6 :  $\Delta$ CK2 $\beta$  induced-EMT is dependent on SNAIL1 Expression.**

**(F) Western Blot analysis** of protein lysates from parental MCF10A cells (WT), CK2 $\beta$  Knock Down cells ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) and cells double-transduced with a lentiviral shRNA against SNAIL1 mRNA ( $\Delta$ SNAI1 SH1 and SH2). Cell lysates were immunoblotted with antibodies against CK2 subunits (CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$ ) ; E- and N- cadherins ; cytoke-  
 ratin 5/6 ; vimentin or HSP90 as loading control.

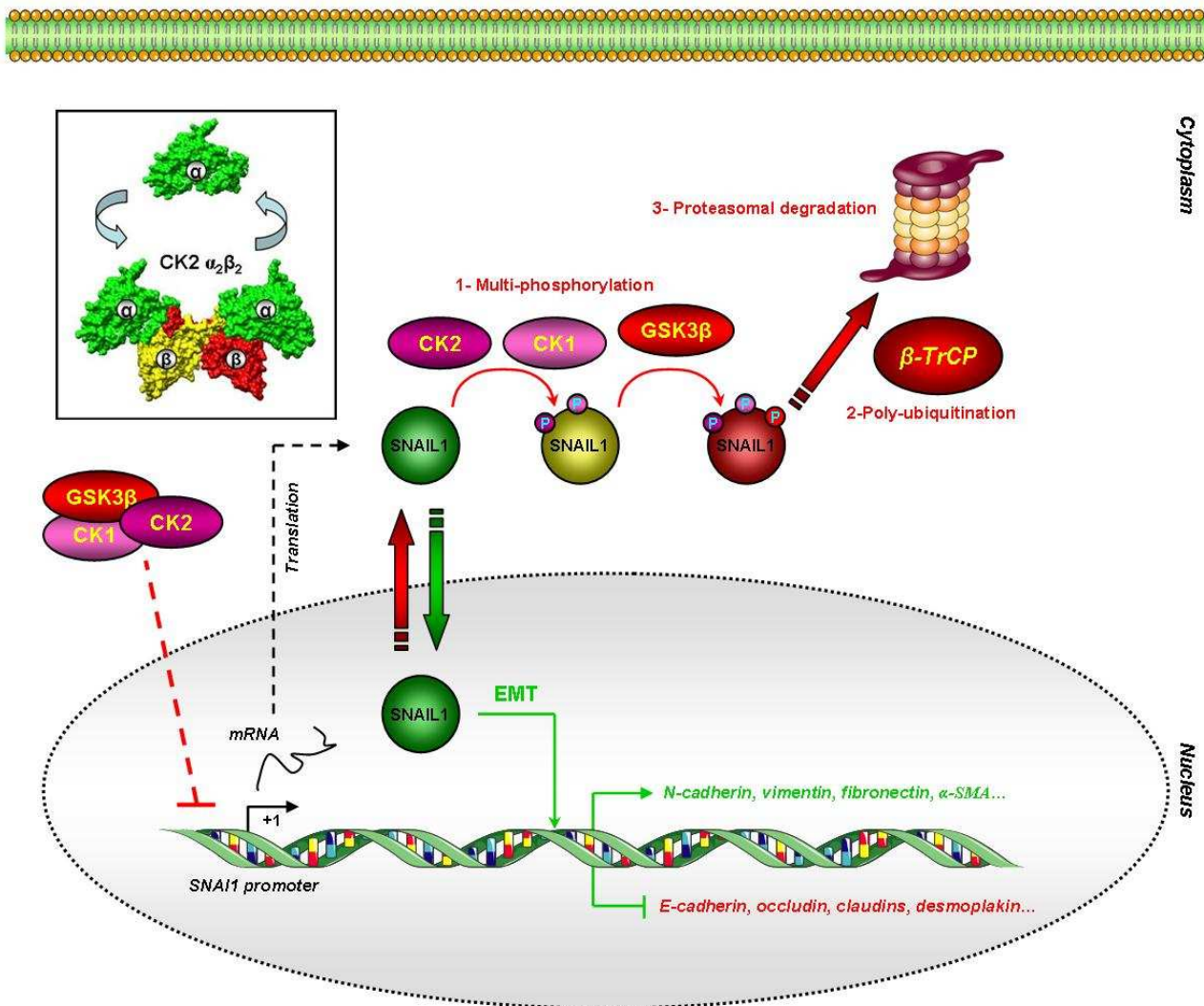
**(G) CK2 kinase activity** : CK2 and crude MCF10A lysates of cells described in (F) were processed for cellulose-phosphopeptide assay as described in *Materials and Methods* using either eIF2 $\beta$ -derived peptide (left panel) or the P29-peptide (right panel). Error bars represent the SEM of samples assayed in duplicates.

A

MPRSFLV RKPS<sup>11</sup>DPNRKPNYSELQDSNPEFTFQQPYDQAHLAAIPPPEILNPTASLPMLIWDSVLAPQAQPIA  
 WASLRQLQES<sup>82</sup>PRVAELTSL<sup>92</sup>DEDS<sup>96</sup>GK<sup>98</sup>GS<sup>100</sup>QPPS<sup>104</sup>PPS<sup>107</sup>PAPS<sup>111</sup>SFSS<sup>115</sup>TSVS<sup>119</sup>SLEAEAYAAFPG  
 LGQVPK<sup>137</sup>QLAQLSEAK<sup>146</sup>DLQARKAFNCKYCNKEYLSLGALKMHIRSHTLPCVCGTCGKAFSRPWLLQGHV  
 RTHTGEKPFSCPHCSRAFADRSNLRHLQTHSDVKKYQCQCARTFS<sup>246</sup>RMSLLHKHQESGCSGCPR

■ GSK3   ■ CK1   ■ GSK3 + CK1   ■ PKA   ■ CK2   ■ PAK1   ■ K/K LOXL2/β-TrCP

B



**Figure 7 : SNAIL1 post-translational regulation by multi-phosphorylation.**

**(A) Human SNAIL1 protein amino-acid primary sequence :** The seven conserved residues of the SNAG N-terminal domain are represented in blue and are closed to PKA phosphorylation site (S<sup>11</sup>). The C-terminal Zinc-Fingers-containing domain (in grey) can be phosphorylated by PAK1. The Serine Rich Domain (SRD : yellow) serves as a platform for several post-translational modifications involving serine/threonine kinases such as CK1, CK2 and GSK3β as well as lysyl-oxydases (LOXL2) and polyubiquitine-ligases (β-TrCP and FBXL14). Because of their proximity to the Nuclear Export Signal (NES : in clear blue), these covalent modifications control both protein stabilization and export from nucleus to cytoplasm.

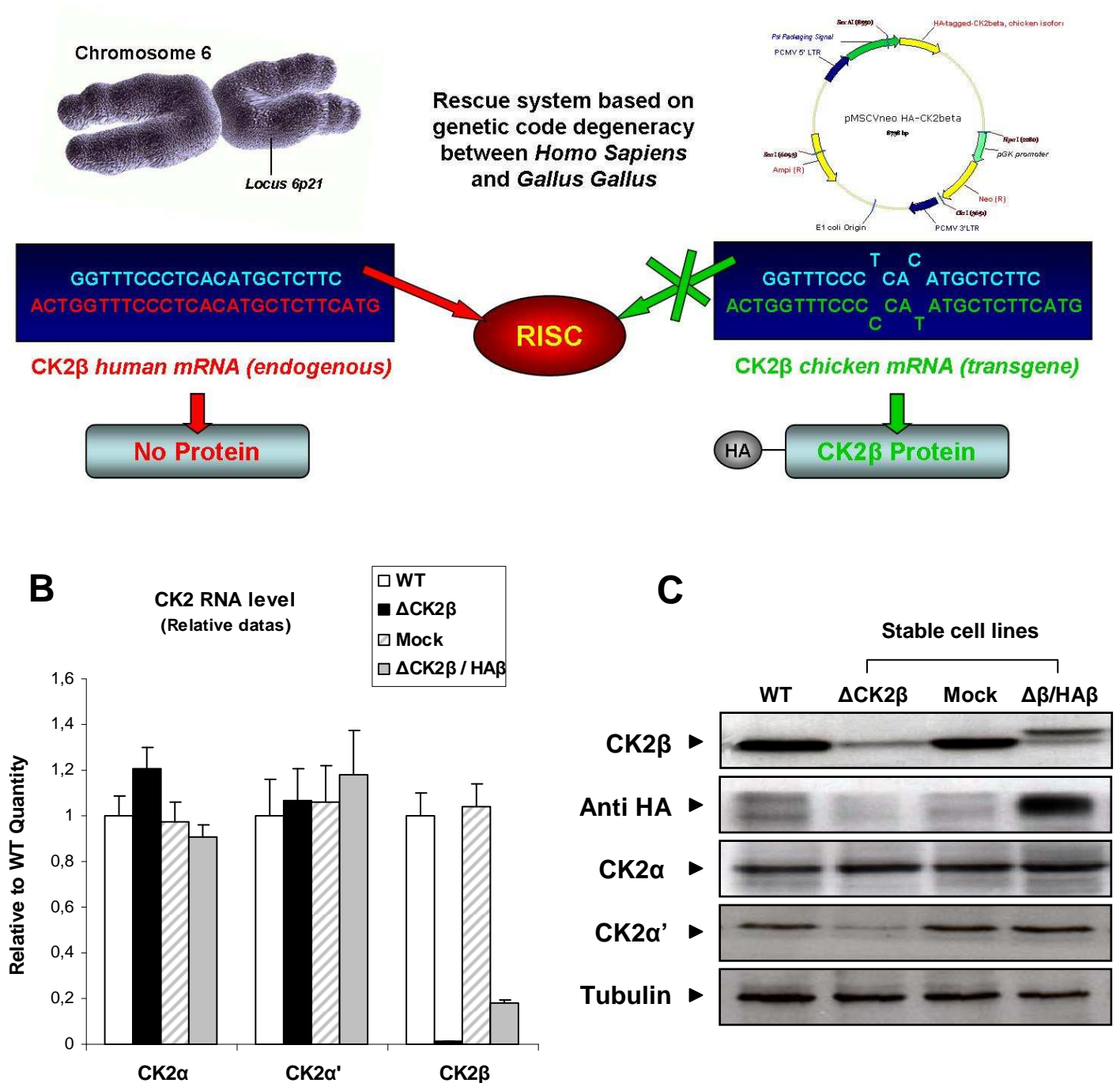
**(B) Model of SNAIL1 regulation by CK2 tetrameric holoenzyme (CK2 α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>) :** In the present study, we demonstrated that CK2α phosphorylation of SNAIL1 is mediated by CK2β regulatory subunit. We presume that dynamic assembling of CK2 α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> holoenzyme cooperates with CK1 to prime subsequent SNAIL1 phosphorylation by GSK3β leading to ubiquitin-mediated SNAIL1 proteasomal degradation. In differentiated epithelial cells, this hierarchical series of covalent modifications ensure low levels of SNAIL1 in order to maintain E-cadherin epithelial prototypic genes (in red). Interestingly, CK2 or GSK3β inhibition leads to a complete EMT-like phenotype in several epithelial cell models (including upregulation of mesenchymal-related genes : in green), suggesting a direct or indirect role for these kinases in SNAIL1 transcriptional regulation (----).



# *Supplemental Figure Data And Tables*



**Fig. SD-1**



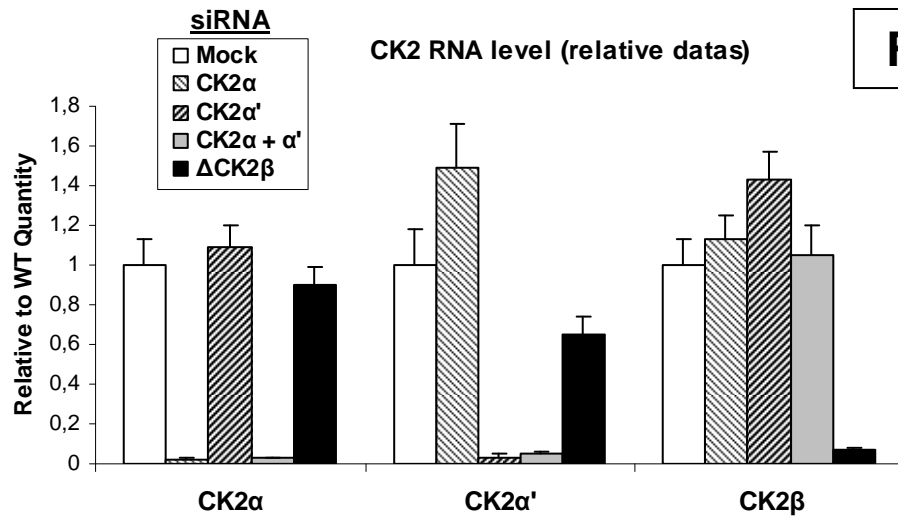
**Figure SD-1 : CK2β stable knockdown and rescue in MCF10A cells.**

**(A) CK2β rescue system :** To rule out off-targets effects potentially induced by shRNA treatment, we engineered a double transduction system to generate control cells expressing both a CK2β specific shRNA (targeting the human gene located on chromosome 6) and the pMSCV-neo vector encoding exogenous HA-tagged-chickenCK2β protein, insensitive to the human-targeting sequence. Interestingly, human and chicken homologues display 100% of homology in their respective primary sequence, allowing a full restoration of CK2  $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme activity.

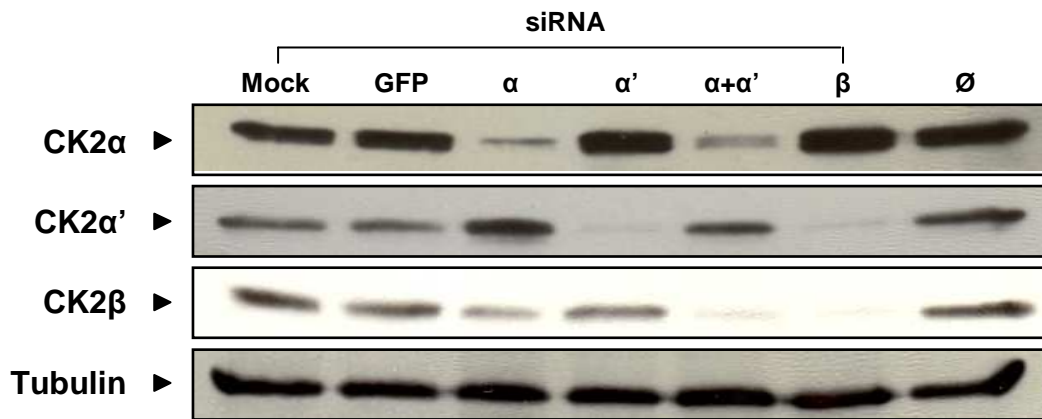
**(B) Quantification of mRNA levels** in MCF10A transduced with shRNA : Expression levels of the different mRNAs encoding CK2 subunits (CK2α, CK2α' and CK2β) was assessed by comparative RT-qPCR in CK2β Knockdown cells (ΔCK2β = black bars), Mock shRNA infected cells (hatched bars) and ΔCK2β cells rescued with chicken-CK2β (ΔCK2β/HAβ = grey bars). For each CK2 subunit, WT-MCF10A cells (white bars) were used as a reference and means of triplicate results were calibrated to HPRT mRNA level and normalized to 1.

**(C) Western blot analysis of CK2 subunits** in equivalent MCF10A cell lines. Lysates were immunoblotted with antibodies against CK2α, CK2α' or CK2β ; γ-ubulin was used as loading control.

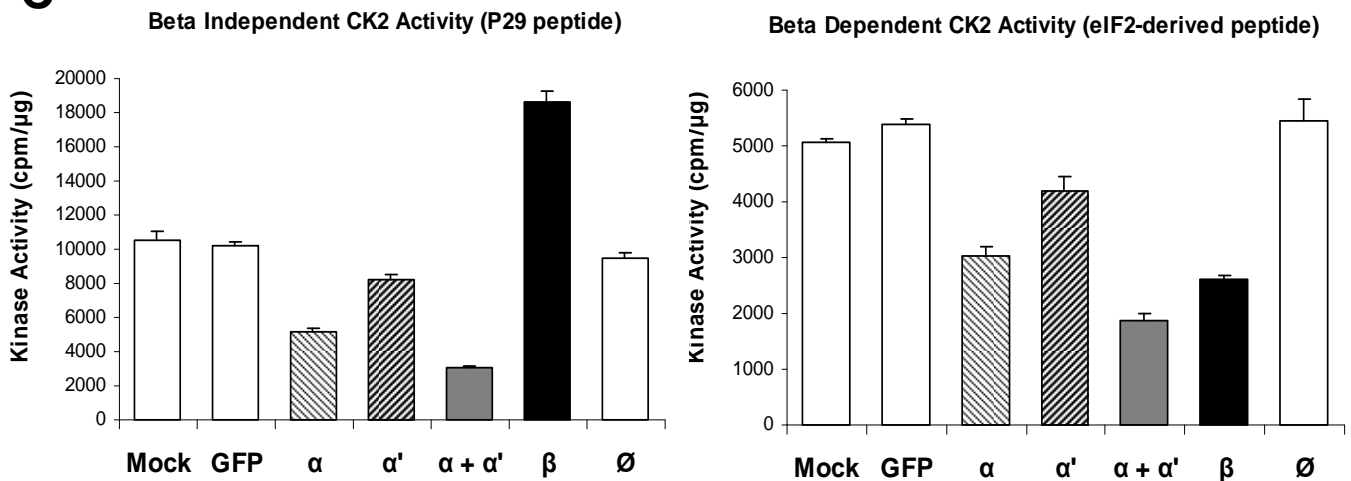
A



B



C

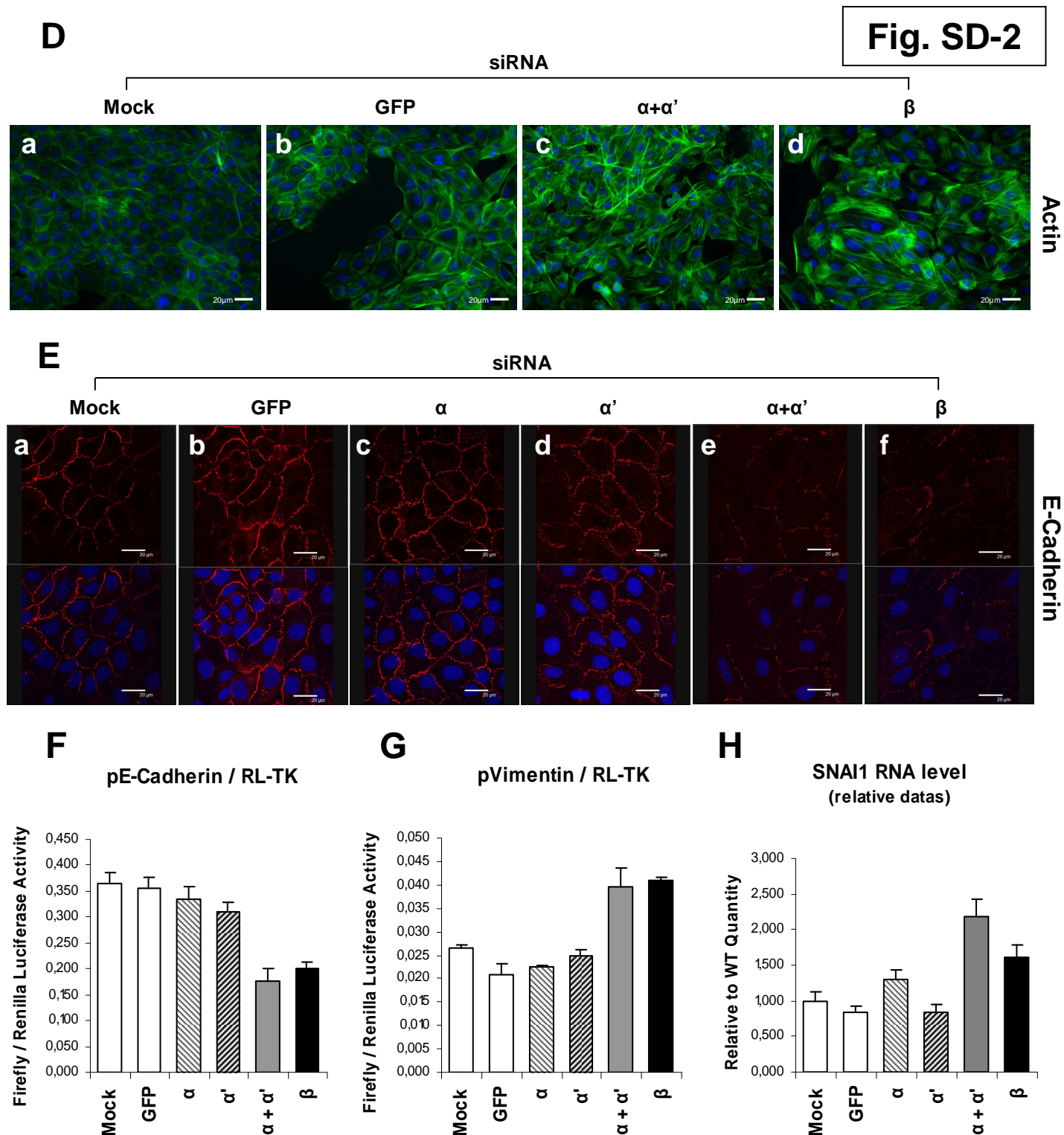


**Figure SD-2 : CK2 unbalanced expression by siRNA induces an EMT-like phenotype in MCF10A cells.**

**(A) Quantification of mRNA levels** in MCF10A transiently treated with siRNA against CK2 subunits (CK2α, CK2α' and CK2β). mRNA expression levels of the different targeted CK2 subunits were tested by comparative RT-qPCR in MCF10A cells untreated (WT) or treated with indicated siRNA for 72h. For each CK2 subunit, HPRT was used as calibrator and GFP-siRNA-treated MCF10A cells were used as the reference and results were normalized to 1.

**(B) Western blot analysis of CK2 subunits** in MCF10A cells untreated (WT) or treated with indicated siRNA for 72h. Cell lysates were then immunoblotted with antibodies against CK2α, CK2α' and CK2β ; detection of γ-tubulin was used as loading control.

**(C) CK2 kinase activity** in each crude lysate of cells previously described in (B) was measured as indicated in *Materials and Methods* using two substrates : either P29-peptide (left panel) or eIF2β-derived peptide (right panel).



**Figure SD-2 : CK2 unbalanced expression by siRNA induces an EMT-like phenotype in MCF10A cells.**

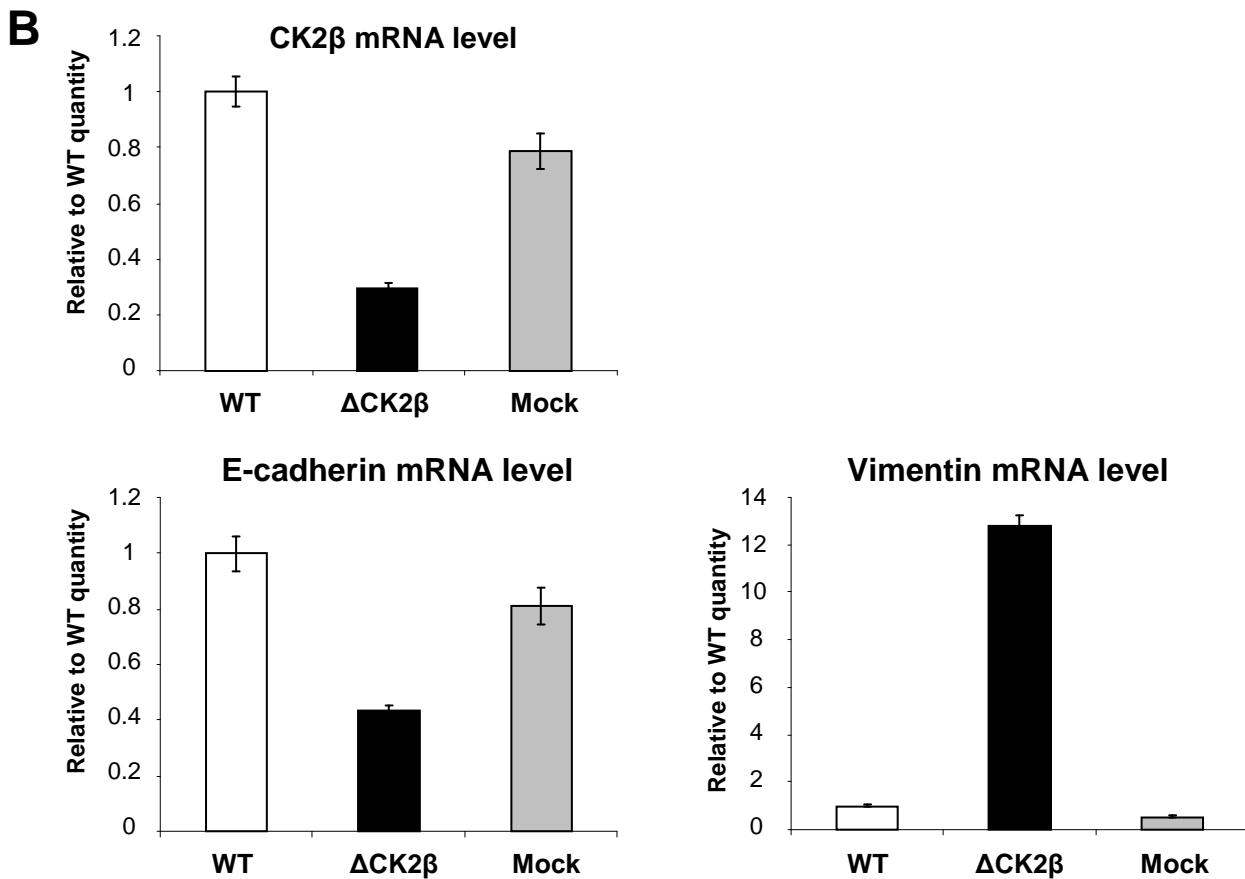
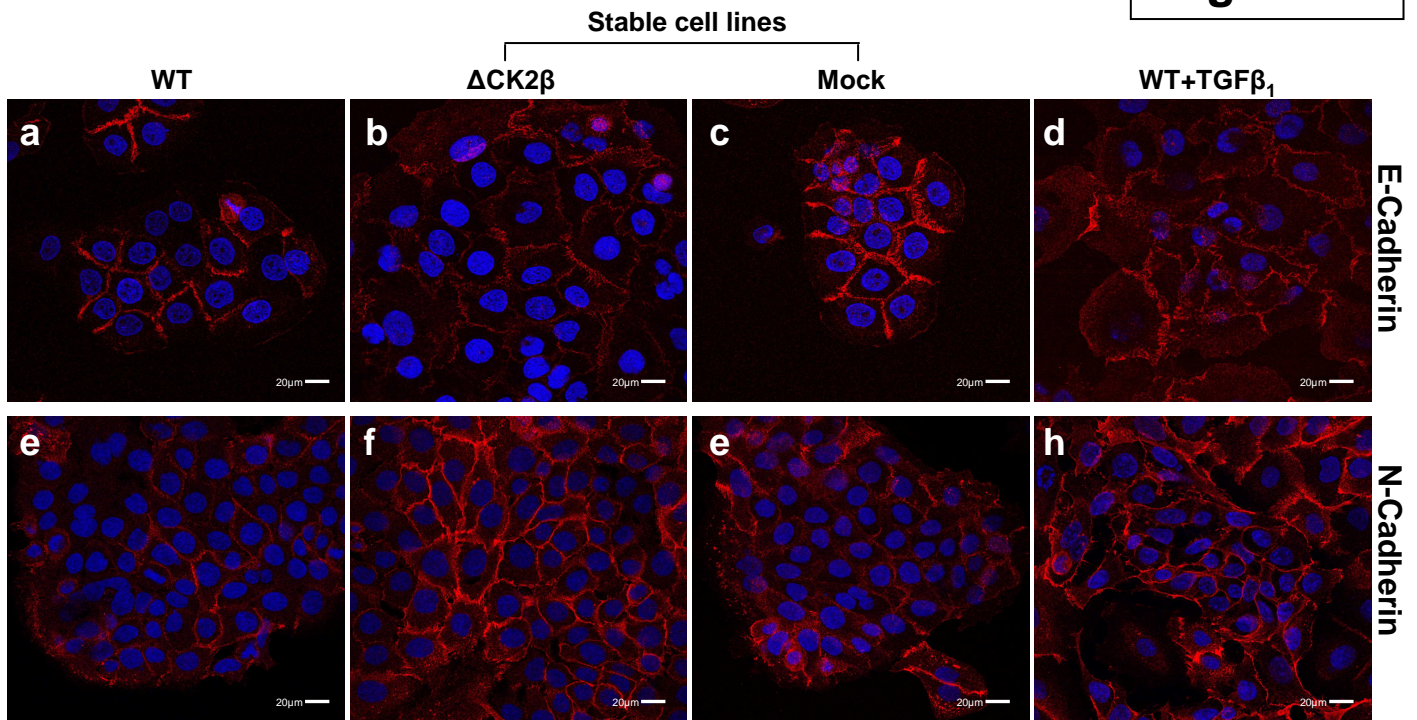
**(D) Actin staining** using Phalloidin in MCF10A transiently treated with siRNA against CK2 subunits (CK2 $\alpha$ , CK2 $\alpha'$  and CK2 $\beta$ ) or control GFP siRNA. Mock cells were treated with lipofectamine 2000 alone. After 72h, cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Magnification = 20X ; Scale bars = 20 $\mu$ m.

**(E) Immunofluorescence images** of previously described cells, showing E-cadherin subcellular localization detected by indirect immunofluorescence using anti-E-cadherin targeting antibody (in red). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Acquisition : confocal images with a 63X magnification (bars = 20 $\mu$ m).

**(F, G) Evaluation of promoter Activities by luciferase reporter assay** : The different MCF10A described in (D) were infected with viral particles encoding either E-Cadherin-promoter/Firefly-Luciferase (F) or vimentin-promoter/Firefly-luciferase (G) together with HTK-promoter/Renilla-luciferase. 48 hours post infection, luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods*. Firefly was normalized to Renilla activity.

**(H) Comparative RT-qPCR** was performed using primers selectively amplifying SNAIL1 human mRNA vs HPRT. WT- MCF10A cells were used as the reference and normalized to 1. Results are represented as mean values  $\pm$  SD.





**Figure SD-3 : CK2 $\beta$  knockdown induces an EMT-like phenotype in HaCaT cells.**

**(A) Immunofluorescence images** of E- and N-cadherin expression (in red) in human HaCaT keratinocytes Parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ), and cells infected with a non-target lentiviral shRNA (Mock). WT-cells treated with 2ng/ml TGF $\beta_1$  were used as positive control for EMT (WT+TGF $\beta_1$ ). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue). Magnification = 63X ; Scale bars = 20 $\mu$ m.

**(B) RT-qPCR analysis** of CK2 $\beta$  regulatory subunit, E-cadherin and vimentin in human HaCaT keratinocytes, parental (WT), CK2 $\beta$  Knock Down ( $\Delta$ CK2 $\beta$ ) and cells infected with a non-target lentiviral shRNA (Mock). The expression level of the different mRNAs was compared by comparative RT-qPCR to HPRT mRNA. MCF10A cells were used as the reference and normalized to 1 to evaluate the modulation in the different conditions.

**Table 1 : pLKO.1 lentiviral shRNA.**

Target (Acc N°)	Lentivirus name	origin	shRNA sequence	selection
CK2 $\beta$ (NM_001320)	SHVRCs-TRCN000003796	Sigma Mission <sup>TM</sup>	TGGTTTCCTCACATGCTCTT	puromycin
			ACCAAAGGGAGTGTACGAGAA	
CK2 $\alpha$ (NM_001895)	pLKO1 neoCK2 $\alpha$ HM1	Home made	GAGTTTACACAGATGTTAA	neomycin
			CTCAAATGTGTCTACAATT	
SNAI1 (NM_005985.2)	pLKO1 neoSNAI1	Home made	ACTCAGATGTCAAGAAGTA	neomycin
	SH1		TGAGTCTACAGTTCTTGAT	
SNAI1 (NM_005985.2)	pLKO1 neoSNAI1	Home made	GACTCTAATCCAGAGTTTA	neomycin
	SH2		CTGAGATTAGGTCTCAAAAT	

**Table 2 : qPCR Primers and siRNA.**

Target (Acc N°)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	siRNA
HPRT (NM_000194)	atggacaggactgaacgtcttgct	ttgagcacacagagggtacaatg	
$\beta$ CK2 (NM_001320)	ttggacctggagcctgatgaagaa	tagcggcgctggatcaatccataa	AAGACUACAUCCAGGACAATT
$\alpha$ CK2 (NM_001895)	tgtccgagttgcttcccataactt	ttgccagcatacaacccaaactcc	CCAGCUGGUUCGAAAAUUAGG
$\alpha'$ CK2 (NM_001896)	agcccaccaccgtatatcaaacct	atgctttctgggtcgggaagaagt	CAGAUUUUAAAGCAACUCUACC
SNAI1 (NM_005985.2)	aggcagctatttcagcctcctgtt	tgacagccattactcacagtcctt	
EGFP			GACGUAAACGGCCACAAGUUC

**Table XD : Directed Mutagenesis Primers.**

Primer name	Sequence
NSA F	CCAGGGTGGCAGAGCTG <b>GCCGCC</b> CTG <b>GCA</b> GATGAGGAC <b>AGT</b> GG
NSA R	CC <b>ACT</b> GTCTCATC <b>TGCC</b> AG <b>GCGGCC</b> CAGCTCTGCCACCCTGG
NSE F	CCAGGGTGGCAGAGCTG <b>GAGGAG</b> CTG <b>GAA</b> GATGAGGAC <b>AGT</b> GG
NSE R	CC <b>ACT</b> GTCTCATC <b>TTCC</b> AG <b>CTCCTC</b> CAGCTCTGCCACCCTGG
CSA F	<b>CCTCTACTT</b> CAGTC <b>GCTGCC</b> TTGGAGGCCGAGGC
CSA R	GCCTCGGCCTCCAA <b>GGCAGC</b> GACT <b>TGA</b> AGT <b>AGAGG</b>
CSE F	<b>CCTCTACTT</b> CAGTC <b>GAAGAG</b> TTGGAGGCCGAGGC
CSE R	GCCTCGGCCTCCAA <b>CTCGCC</b> GACT <b>TGA</b> AGT <b>AGAGG</b>





## *Extra Figure Data*



A

Fig. XD-1

Site	Kinase	Score	Site	Kinase	Score	Site	Kinase	Score	Site	Kinase	Score
S-4	p38MAPK	0.41	S-90	CKII	0.51	T-116	PKC	0.52	T-201	PKG	0.40
S-4	PKC	0.61	S-90	CKI	0.42	T-116	CaM-II	0.43	T-201	cdc2	0.42
S-4	CaM-II	0.43	S-90	CaM-II	0.45	T-116	GSK3	0.44	T-201	GSK3	0.45
S-4	cdc2	0.54	S-90	cdc2	0.45	S-117	RSK	0.43	T-203	CaM-II	0.46
S-4	GSK3	0.47	S-90	GSK3	0.46	S-117	CaM-II	0.46	T-203	GSK3	0.44
S-11	RSK	0.49	S-92	CKII	0.53	S-117	cdc2	0.48	S-209	CaM-II	0.43
S-11	CaM-II	0.46	S-92	CKI	0.61	S-117	GSK3	0.43	S-209	cdc2	0.46
S-11	PKA	0.70	S-92	CaM-II	0.42	S-119	CKII	0.62	S-209	GSK3	0.47
S-11	PKG	0.60	S-92	cdc2	0.43	S-119	CaM-II	0.43	S-214	CaM-II	0.44
S-11	cdc2	0.53	S-92	GSK3	0.44	S-119	cdc2	0.55	S-214	cdc2	0.52
S-11	GSK3	0.45	S-96	CKI	0.54	S-119	GSK3	0.42	S-214	GSK3	0.47
Y-19	SRC	0.43	S-96	PKC	0.45	S-120	CKII	0.50	S-221	CaM-II	0.43
Y-19	EGFR	0.54	S-96	CaM-II	0.45	S-120	DNAPK	0.51	S-221	cdc2	0.51
Y-19	INSR	0.44	S-96	cdc2	0.43	S-120	CaM-II	0.44	S-221	GSK3	0.44
S-20	CKII	0.48	S-96	GSK3	0.47	S-120	GSK3	0.42	T-229	CKI	0.46
S-20	CaM-II	0.44	S-100	DNAPK	0.62	Y-126	SRC	0.47	T-229	PKC	0.50
S-20	GSK3	0.44	S-100	ATM	0.59	Y-126	EGFR	0.53	T-229	CaM-II	0.44
S-25	CKII	0.56	S-100	PKC	0.59	Y-126	INSR	0.49	T-229	GSK3	0.46
S-25	CaM-II	0.45	S-100	CaM-II	0.44	S-143	CaM-II	0.44	S-231	CaM-II	0.44
S-25	cdc2	0.50	S-100	PKG	0.41	S-143	cdc2	0.43	S-231	cdc2	0.49
S-25	GSK3	0.45	S-100	cdc2	0.48	S-143	GSK3	0.43	S-231	GSK3	0.42
T-30	CaM-II	0.43	S-100	GSK3	0.49	Y-158	INSR	0.50	Y-236	EGFR	0.42
T-30	GSK3	0.44	S-104	p38MAPK	0.53	Y-163	INSR	0.49	Y-236	INSR	0.43
T-53	CaM-II	0.43	S-104	CaM-II	0.44	S-165	CKI	0.43	T-244	CaM-II	0.44
T-53	GSK3	0.46	S-104	cdc2	0.52	S-165	PKC	0.49	T-244	PKG	0.42
S-55	DNAPK	0.53	S-104	GSK3	0.55	S-165	CaM-II	0.43	T-244	cdc2	0.47
S-55	CaM-II	0.46	S-104	cdk5	0.75	S-165	PKA	0.49	T-244	GSK3	0.47
S-55	PKA	0.64	S-107	p38MAPK	0.52	S-165	GSK3	0.47	S-246	RSK	0.47
S-55	cdc2	0.41	S-107	CaM-II	0.43	S-175	CaM-II	0.43	S-246	CaM-II	0.49
S-55	GSK3	0.44	S-107	cdc2	0.47	S-175	PKA	0.63	S-246	PKA	0.77
S-63	PKC	0.56	S-107	GSK3	0.53	S-175	cdc2	0.42	S-246	PKG	0.41
S-63	CaM-II	0.47	S-107	cdk5	0.68	S-175	GSK3	0.46	S-246	GSK3	0.47
S-63	cdc2	0.51	S-111	CaM-II	0.44	T-177	DNAPK	0.42	S-249	CKI	0.45
S-63	GSK3	0.43	S-111	GSK3	0.51	T-177	CaM-II	0.43	S-249	DNAPK	0.43
S-76	DNAPK	0.50	S-111	cdk5	0.43	T-177	PKA	0.59	S-249	PKC	0.54
S-76	PKC	0.60	S-112	PKC	0.59	T-177	cdc2	0.40	S-249	CaM-II	0.45
S-76	CaM-II	0.43	S-112	CaM-II	0.42	T-177	GSK3	0.45	S-249	PKA	0.68
S-76	GSK3	0.44	S-112	cdc2	0.62	T-184	p38MAPK	0.40	S-249	cdc2	0.42
S-82	p38MAPK	0.50	S-112	GSK3	0.45	T-184	PKC	0.63	S-249	GSK3	0.44
S-82	CaM-II	0.45	S-114	CKI	0.46	T-184	CaM-II	0.42	S-257	CaM-II	0.46
S-82	cdc2	0.43	S-114	PKC	0.49	T-184	PKG	0.41	S-257	PKA	0.45
S-82	GSK3	0.50	S-114	CaM-II	0.44	T-184	GSK3	0.47	S-257	cdc2	0.49
T-89	CKII	0.54	S-114	cdc2	0.45	S-190	CKI	0.45	S-257	GSK3	0.45
T-89	CKI	0.43	S-114	GSK3	0.44	S-190	CaM-II	0.46	S-260	CaM-II	0.41
T-89	p38MAPK	0.41	S-115	PKC	0.49	S-190	PKA	0.46	S-260	cdc2	0.44
T-89	CaM-II	0.41	S-115	CaM-II	0.44	S-190	cdc2	0.40	S-260	GSK3	0.47
T-89	cdc2	0.46	S-115	cdc2	0.41	S-190	GSK3	0.47			
T-89	GSK3	0.43	S-115	GSK3	0.46	T-201	CKI	0.40			
						T-201	CaM-II	0.45			

SRD N-terminal Serine/threonine cluster = **NS** (T<sup>89</sup> - S<sup>90</sup> - S<sup>92</sup>)

SRD C-terminal Serine cluster = **CS** (S<sup>119</sup> - S<sup>120</sup>)

Figure XD-1 : SNAIL1 SRD mutagenesis based on NetPhosK prediction.

(A) NetPhosK prediction of CK2 phosphosites : In the Serine Rich Domain, five consensus motifs were found to exhibit a score upper than 0,50 (probability of phosphorylation upper than 50%) : T<sup>89</sup>, S<sup>90</sup> and S<sup>92</sup> form a N-terminal S/T cluster (NS) and S<sup>119</sup> and S<sup>120</sup> constitute a second motif located at the end of the SRD that we called C-terminal S cluster (CS). Moreover, this profile displays relative high scores for CK2 phosphorylation of residues S<sup>20</sup> and S<sup>25</sup>.

- SNAIL1 Protein Access Number (*Homo Sapiens*) : NP\_005976.2

- NetPhosK 1.0 Server : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/> (ExPASy tools)

**B** SNAIL1 WT

MPRSFLV RKPS<sup>11</sup>DPNRKPNYSELQDSNPEFTFQQPYDQAHLLAAIPPEILNPTASLPMLIWDSVLAPQAQPIA  
 WASLR LQES<sup>82</sup>PRVAELTSL<sup>92</sup>DEDS<sup>96</sup>GK<sup>98</sup>GS<sup>100</sup>QPPS<sup>104</sup>PPS<sup>107</sup>PAPS<sup>111</sup>SFSS<sup>115</sup>TSVS<sup>119</sup>SLEAEAYAAFP  
 LGQVPK<sup>137</sup>QLAQLSEAK<sup>146</sup>DLQARKAFNCKYCNKEYLSLGALKMHRSHTLPCVCGTCGKAFSRPWLLQGHV  
 RTHRTGKPFSCPHCSRAFADRSNLRHLQTHSDVKKYQCQACARTFS<sup>246</sup>RMSLLHKKHQESGCSGCPR

GSK3 CK1 GSK3 + CK1 PKA CK2 PAK1 K/K LOXL2/β-TrCP

MPRSFLV RKPS<sup>11</sup>DPNRKPNYSELQDSNPEFTFQQPYDQAHLLAAIPPEILNPTASLPMLIWDSVLAPQAQPIA  
 WASLR LQESPRVAELT<sup>89</sup>SL<sup>90</sup>LS<sup>92</sup>DEDS<sup>96</sup>GK<sup>98</sup>GS<sup>100</sup>QPPS<sup>104</sup>PPS<sup>107</sup>PAPS<sup>111</sup>SFSS<sup>115</sup>TSVS<sup>119</sup>S<sup>120</sup>LEAEAYAAFP  
 PGLGQVPK<sup>137</sup>QLAQLSEAK<sup>146</sup>DLQARKAFNCKYCNKEYLSLGALKMHRSHTLPCVCGTCGKAFSRPWLLQGHV  
 HVRTHRTGKPFSCPHCSRAFADRSNLRHLQTHSDVKKYQCQACARTFS<sup>246</sup>RMSLLHKKHQESGCSGCPR

GSK3 CK1 GSK3 + CK1 CK2 (NetPhosK prediction)

**C** SNAIL1 Mutants (NCSA and NCSE)

MPRSFLV RKPS<sup>11</sup>DPNRKPNYSELQDSNPEFTFQQPYDQAHLLAAIPPEILNPTASLPMLIWDSVLAPQAQPIA  
 WASLR LQESPRVAEL<sup>89</sup>A<sup>90</sup>LA<sup>92</sup>DEDS<sup>96</sup>GK<sup>98</sup>GS<sup>100</sup>QPPS<sup>104</sup>PPS<sup>107</sup>PAPS<sup>111</sup>SFSS<sup>115</sup>TSVA<sup>119</sup>A<sup>120</sup>LEAEAYAAFP  
 FPG LGQVPK<sup>137</sup>QLAQLSEAK<sup>146</sup>DLQARKAFNCKYCNKEYLSLGALKMHRSHTLPCVCGTCGKAFSRPWLLQGHV  
 HVRTHRTGKPFSCPHCSRAFADRSNLRHLQTHSDVKKYQCQACARTFS<sup>246</sup>RMSLLHKKHQESGCSGCPR

GSK3 CK1 GSK3 + CK1 CK2 Mutagenesis (NetPhosK prediction) : NCSA

MPRSFLV RKPS<sup>11</sup>DPNRKPNYSELQDSNPEFTFQQPYDQAHLLAAIPPEILNPTASLPMLIWDSVLAPQAQPIA  
 WASLR LQESPRVAEL<sup>89</sup>E<sup>90</sup>LE<sup>92</sup>DEDS<sup>96</sup>GK<sup>98</sup>GS<sup>100</sup>QPPS<sup>104</sup>PPS<sup>107</sup>PAPS<sup>111</sup>SFSS<sup>115</sup>TSVE<sup>119</sup>E<sup>120</sup>LEAEAYAAFP  
 PGLGQVPK<sup>137</sup>QLAQLSEAK<sup>146</sup>DLQARKAFNCKYCNKEYLSLGALKMHRSHTLPCVCGTCGKAFSRPWLLQGHV  
 HVRTHRTGKPFSCPHCSRAFADRSNLRHLQTHSDVKKYQCQACARTFS<sup>246</sup>RMSLLHKKHQESGCSGCPR

GSK3 CK1 GSK3 + CK1 CK2 Mutagenesis (NetPhosK prediction) : NCSE

NCSA = NSA (T89A-S90A-S92A) + CSA (S119A-S120A)

NCSE = NSE (T89E-S90E-S92E) + CSA (S119E-S120E)

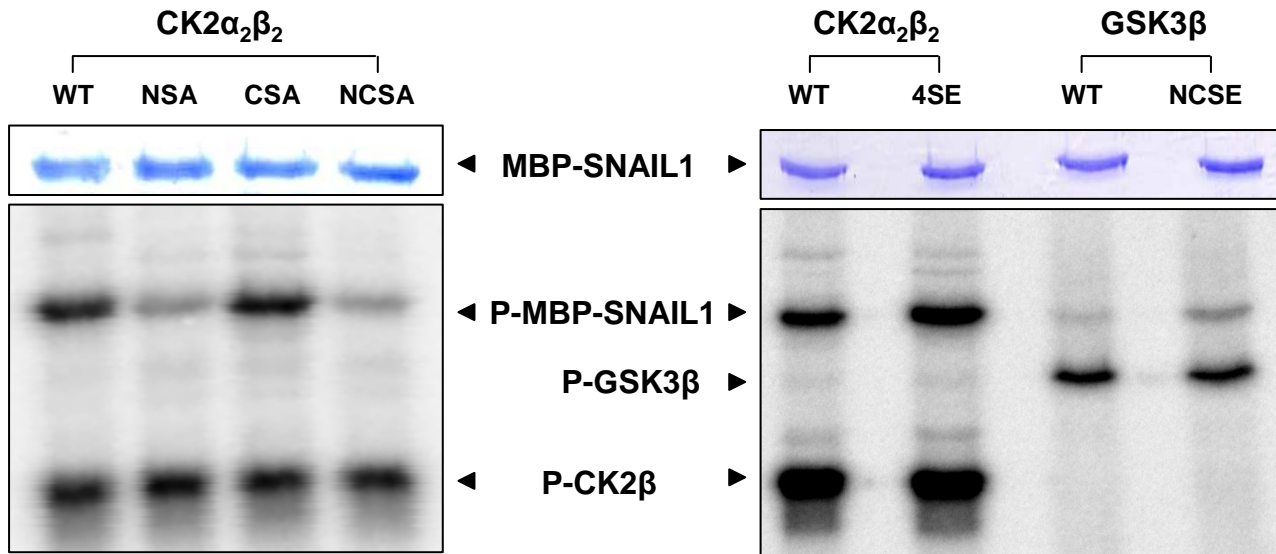
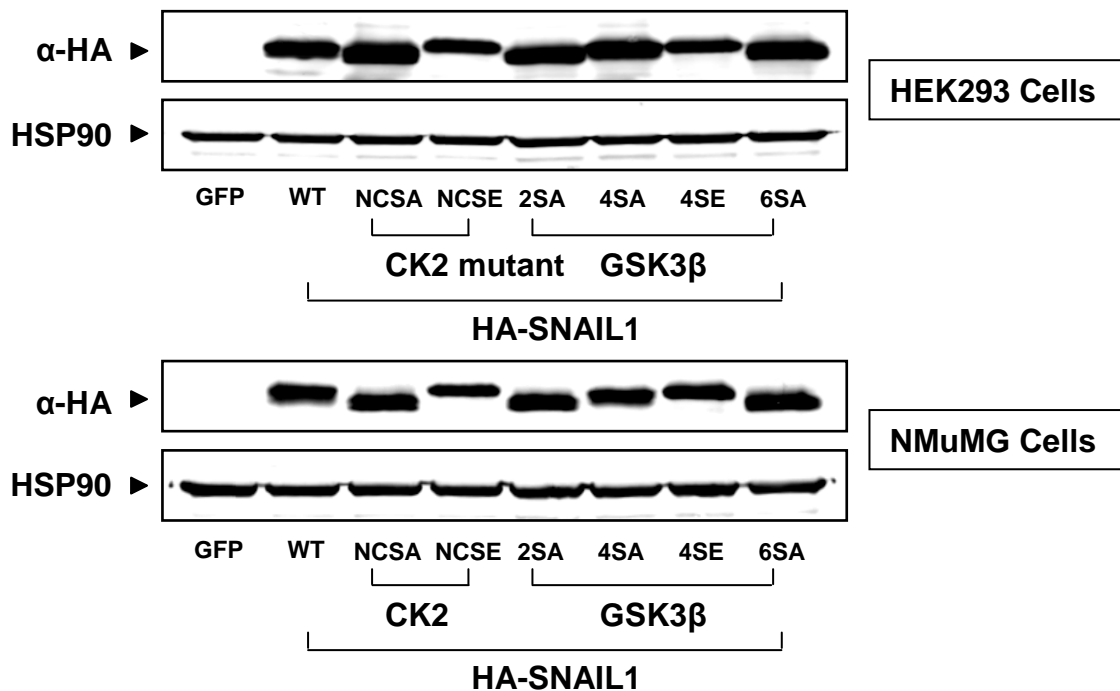
6SA = 2SA (S96A-S100A) + 4SA (S104A-S107A-S111A-S115A)

6SE = 2SE (S96E-S100E) + 4SE (S104E-S107E-S111E-S115E)

**Figure XD-1 : SNAIL1 SRD mutagenesis based on NetPhosK prediction.**

**(B) SNAIL1 phosphorylation :** The Serine Rich Domain (SRD : yellow) is phosphorylated on many different residues by CK1, CK2 and GSK3β. Several other covalent modifications (Lysyl oxydation, ubiquitination...) can occur along the entire protein sequence (upper panel). Based on NetPhosK prediction CK2 should recognize two serines together with one threonine in the SRD N-terminal cluster and two serines into the C-terminal cluster. All these residues are tightly closed from previously identified GSK3β phosphosites (clusters 2S and 4S) that control both protein stabilization and export from nucleus to cytoplasm [38].

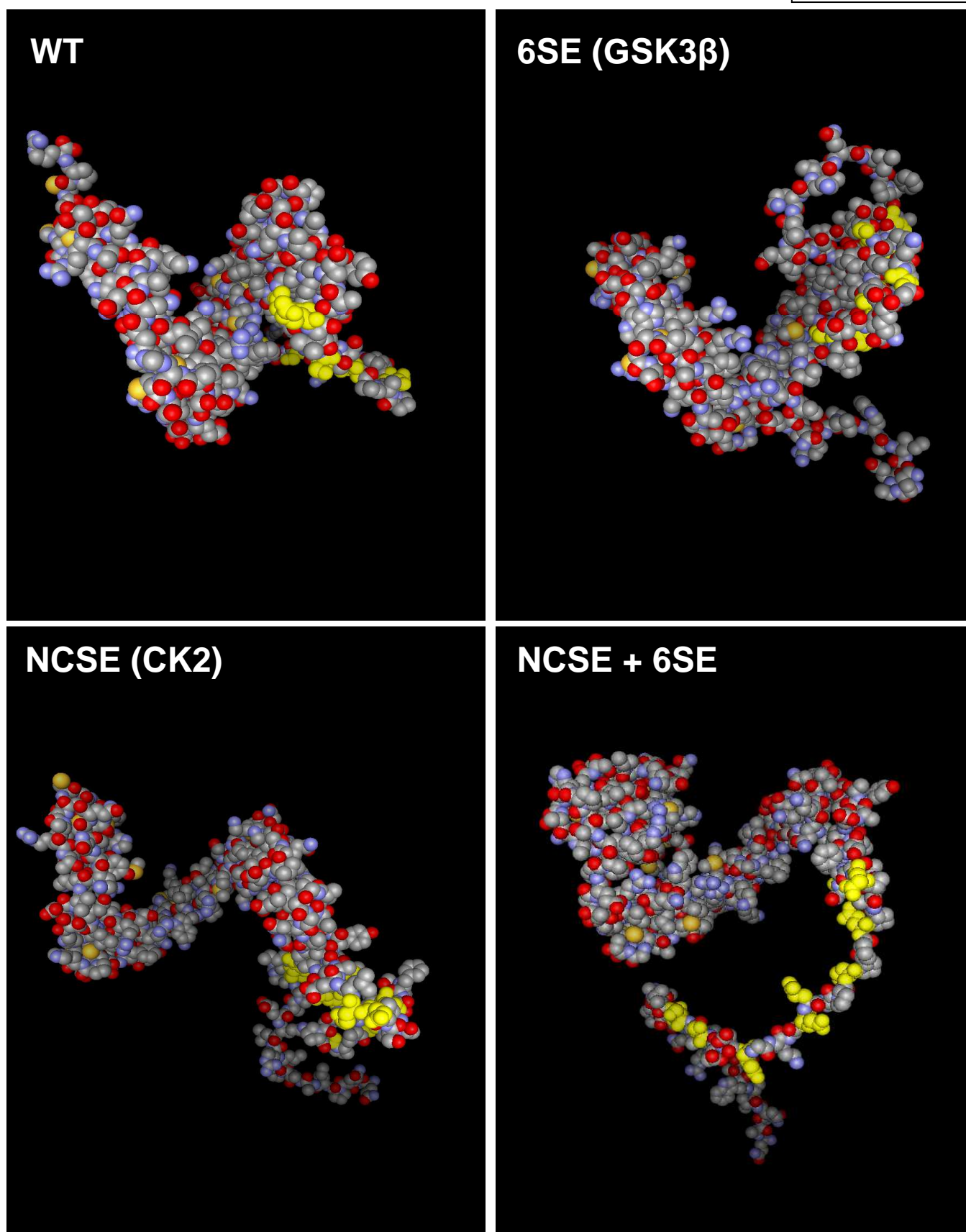
**(C) Directed mutagenesis of SNAIL1 SRD :** N-terminal and C-terminal cluster were mutated separately or together using Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and specific primers (table XD-3). S/A mutagenesis (NSA, CSA and NCSA) is design to abolish theoretical CK2 phosphorylation. On the contrary, S/E mutations (NSE, CSE and NCSE) are supposed to mimic a constitutive phosphorylation of serines and threonines (pseudo-phosphorylation).

**Fig. XD-2****A****B****Figure XD-2 : Cooperation of CK2 and GSK3 in SNAIL1 phosphorylation and destabilization.**

**(A) SNAIL1 phosphorylation by CK2 $\alpha_2\beta_2$  holoenzyme** : stoichiometric amounts of CK2 $\alpha$  and CK2 $\beta$  were incubated during 5 minutes at RT with WT-MBP-SNAIL1 (1 $\mu$ g) or with the different S/A mutants in the presence of radiolabeled [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP/MgCl $_2$  (left panel). In a second experiment, S/E pseudo-phosphorylated mutants for either GSK3 $\beta$  or CK2 phosphosites (respectively 4SE and NCSE) were incubated with recombinant CK2 $\alpha_2\beta_2$  or GSK3 $\beta$ , respectively (right panel). Phosphorylation levels were compared to those obtained with WT-SNAIL1 protein in the same experimental conditions and Coomassie staining was used as a loading control.

**(B) Western blot analysis of SNAIL1 mutants** : HA-tagged human SNAIL1 variants under CMV promoter control were transfected into human HEK293 and murine NMuMG cells. Cell lysates were immunoblotted with antibodies against Influenza Hemagglutinin (HA) and HSP90 that was used as a loading control.

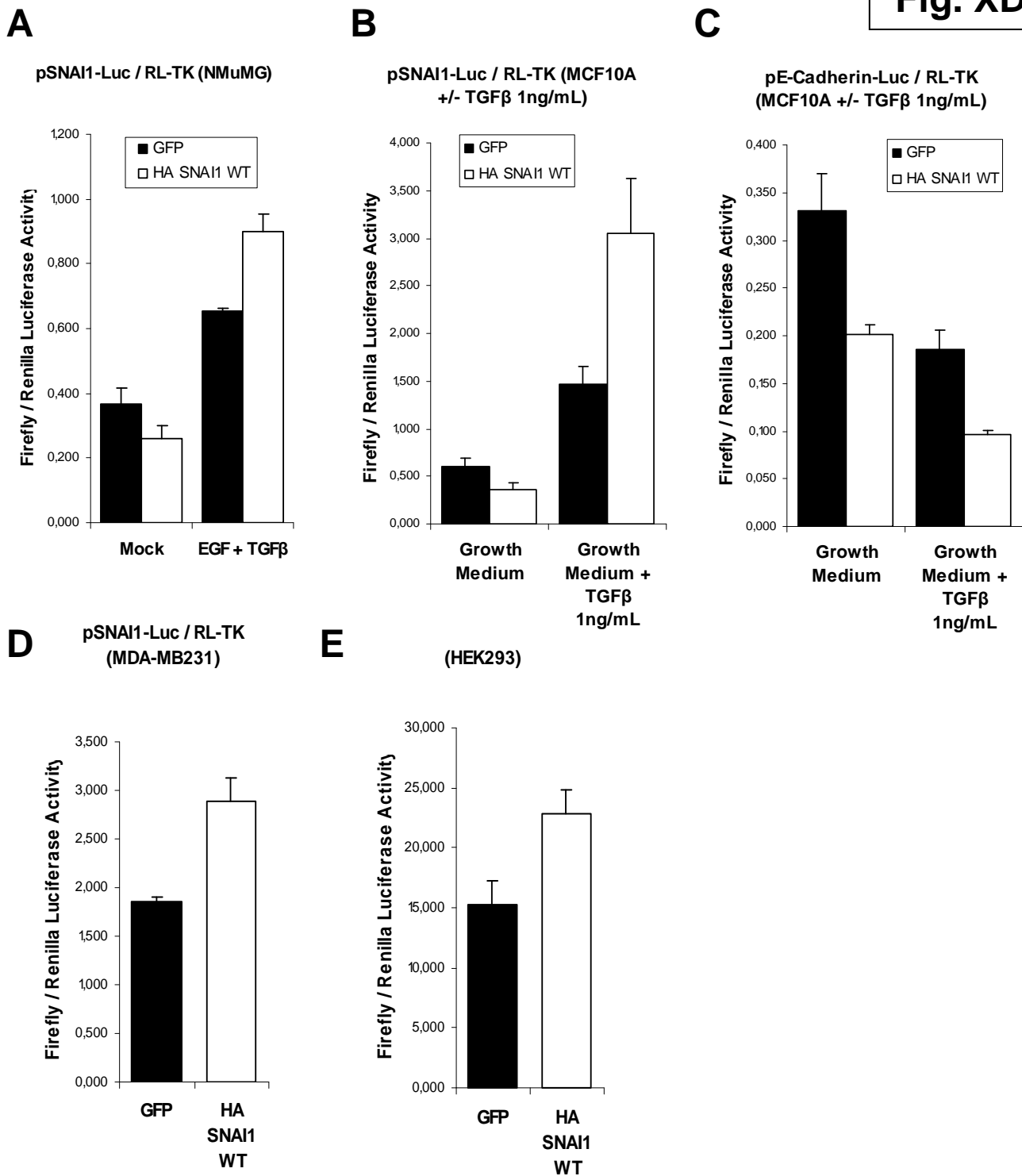
**Fig. XD-3**



**Figure XD-3 : Modelisation of SRD phosphorylation influence on SNAIL1 N-terminal-half folding.**

Primary sequence of WT-SNAIL1 and pseudo-phosphorylated S/E mutants were submitted to LOMETS server from Zhang lab (Expasy tools : <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/LOMETS/>). Models with the highest predictive scores were selected and analysed using PDB 3D molecule viewer (Invitrogen) ; serines and threonines replaced by glutamic acid residues are marked in yellow.





**Figure XD-4 : SNAIL1 transcriptional activity is cell-type dependent.**

**(A, B) Evaluation of SNAIL1 promoter activity** in NMuMG and MCF10A cells transfected with pSNAI1/Firefly-luciferase reporter constructs and RL-TK calibrator. Luciferase activity was measured after 24h ; cells were eventually treated during 12h with TGFβ<sub>1</sub> and EGF. Results are represented as triplicate mean values ± SD.

**(C) CDH1 repression** in MCF10A cells that were transiently infected with lentiviral particles encoding E-cadherin-promoter/Firefly luciferase (D) with RL-TK calibrator. Bioluminescence was evaluated 48 hours post infection.

**(D, E) SNAIL1 promoter activity** in MDA-MB231 or HEK293 cell lines transfected with pSNAI1/Firefly-luciferase reporter constructs and RL-TK calibrator. Luciferase activity was measured as described in (A, B).



## *Conclusions et perspectives*



## A. Régulation transcriptionnelle de *SNAIL1* dans les cellules MCF10A

Les résultats précédemment décrits ont permis de démontrer que, dans les cellules épithéliales mammaires MCF10A, la perte de phosphorylation de la protéine *SNAIL1* par l'holoenzyme tétramérique  $CK2\alpha_2\beta_2$  est responsable de sa stabilisation post-traductionnelle en lien avec une hyperactivation transcriptionnelle et l'induction d'un phénotype «EMT-like». De façon intéressante, ces résultats sont très similaires à ceux observés par les équipes d'A.G. Herreros et A. Mercurio suite à l'inhibition chimique ou nucléotidique de la kinase  $GSK3\beta$  dans plusieurs lignées cellulaires, dont les MCF10A.[510] *In vitro*, il existe une coopération entre  $CK2\alpha_2\beta_2$  et  $GSK3\beta$  pour la reconnaissance des résidus hydroxylés présents dans le domaine SRD de la protéine *SNAIL1* suggérant une coordination des mécanismes d'action de ces deux kinases dans les cellules épithéliales différenciées et au cours de l'EMT. En 2006, deux études «clé» décrivant pour la première fois des phénomènes d'auto-activation/répression transcriptionnelle directe de l'EMT ont également conduit à aborder la régulation des protéines de la famille *SNAIL* sous un jour nouveau.[639, 641] En amont de la séquence codante du gène *SNAIL* humain, on trouve 4 motifs E-box, dont le plus proximal est conservé dans de nombreuses espèces. Dans les cellules SW480, l'expression ectopique de *SNAIL1* aboutit à une répression de sa propre séquence promotrice en parallèle de celle de la E-cadhérine.[639] Un tel « auto-rétrocontrôle négatif » permet probablement, dans certains cas précis, de limiter la durée d'action de ce facteur sur les gènes épithéliaux et ainsi d'obtenir une réversibilité rapide du phénotype par transition mésenchymo-épithéliale (MET). A l'inverse, dans la crête neurale, *SNAIL2/SLUG* peut lier son propre promoteur au niveau d'une E-box mais en exerçant sur lui un rétrocontrôle positif, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les facteurs de la famille *SNAIL* pourraient exercer un contrôle aussi bien négatif que positif sur la transcription, en fonction des co-facteurs auxquels ils sont associés.[641]

En utilisant différents modèles cellulaires, j'ai pu observer que face à la surexpression de *SNAIL1*, la réponse de son promoteur fusionné à la luciférase pouvait varier en réponse à la stimulation de la voie  $TGF\beta$ . De façon intéressante, la liaison de *SNAIL1* au promoteur de la E-cadhérine peut être renforcée par une interaction physique avec *Smad3/4*, également lié au promoteur du gène *CDH1* au niveau des sites SBE (*Smad Binding Elements*) adjacents aux motifs E-box.[589] *In vitro*, la transcription de *SNAIL* est fortement induite en réponse au  $TGF\beta$  grâce à la présence d'un élément de réponse SBE contenu dans le promoteur *SNAIL* à proximité de séquences riches en répétitions A-T reconnues par le facteur *HMGA2*.[618]

En position 5' de cette région, se trouve également une E-box et il est donc envisageable que la protéine *SNAIL1* puisse interagir avec le complexe *Smads/HMGA2* pour réguler sa propre séquence en coopération avec les facteurs de remodelage de la chromatine. Cependant, aucune donnée n'a été établie à ce jour sur la formation d'un tel complexe et il ne faut pas négliger la possibilité d'une «prédominance» de l'activation par la voie  $TGF\beta$  sur le mécanisme d'auto-répression de *SNAIL1* ; celui-ci, même indépendant, serait alors masqué dans les conditions expérimentales utilisées. De plus, ces résultats mériteraient d'être confirmés par l'analyse de l'expression des transcrits *SNAIL1* en parallèle de la régulation du promoteur (en utilisant par

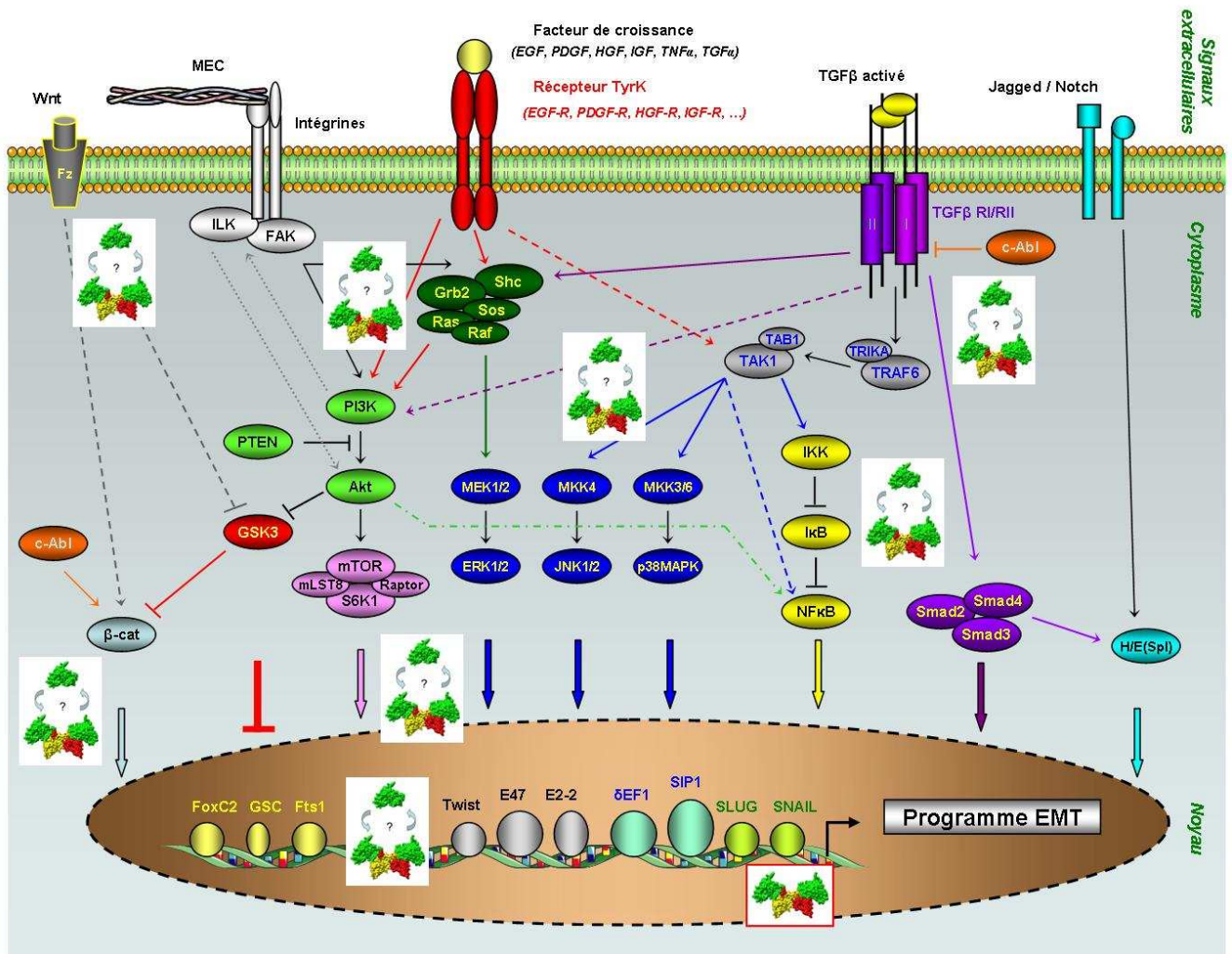
exemple des amorces amplifiant spécifiquement des séquences non présentes dans le transgène utilisé pour la surexpression : introns, 3'UTR...).

Des études récentes suggèrent également que la «direction» dans laquelle s'orientent ces mécanismes d'autorégulation pourrait être fortement influencée par le contexte cellulaire, en particulier par le niveau d'expression de la E-cadhérine et l'interaction de SNAIL1 avec le pool nucléaire de  $\beta$ -caténine (notion de « priming » des cellules pour l'induction de l'EMT).[536, 626, 639] Dans les kératinocytes primaires et la lignée HaCaT, CK2 est responsable de la phosphorylation de la E-cadhérine nécessaire à la stabilisation de son interaction avec la  $\beta$ -caténine.[725] Il n'est pas établi si la reconnaissance de ce substrat présente une dépendance vis-à-vis des sous-unités régulatrices CK2 $\beta$  mais nous avons pu observer que dans les cellules HaCaT, leur déplétion par ARN interférence est responsable de l'induction d'un phénotype «EMT-like» en l'absence d'activation transcriptionnelle de SNAIL1. Dans ce contexte, il serait pertinent d'étudier l'impact de la stabilisation du complexe E-cadhérine/ $\beta$ -caténine sur l'apparition de ces changements morphologiques (par exemple par la surexpression de E-cadhérine constitutivement pseudo-phosphorylée par mutagenèse S/E). La E-cadhérine est considérée comme un suppresseur de tumeur et sa répression est un élément initiateur suffisant pour de nombreuses voies de signalisation qui conduisent à l'EMT et/ou à une transformation tumorale dans de nombreux systèmes *in vitro*. [144, 259-262] Dans les cellules épithéliales mammaires HMLE, son extinction par ARN interférence aboutit à la transformation et à l'acquisition de caractères de pluripotence ainsi qu'une résistance à l'apoptose induite par plusieurs drogues chimiques.[263] A l'inverse, une surexpression de la E-cadhérine tend à diminuer, voire à abolir les capacités invasives de plusieurs lignées tumorales en grande partie via la rétention membranaire de la  $\beta$ -caténine mais aussi par une action de répression (ou de non induction) de la transcription de SNAIL1.[264-266]

Dans cette étude, nous avons pu démontrer que l'apparition des changements morphologiques observés dans les cellules MCF10A- $\Delta$ CK2 $\beta$  était dépendante de l'expression de SNAIL1. L'étude de la réversibilité de ce même phénotype par l'apport ectopique de E-cadhérine pourrait là encore apporter des réponses décisives dans la compréhension des phénomènes de maintien de la polarité des cellules épithéliales par la protéine-kinase CK2. Néanmoins, ce raisonnement doit être tempéré par le fait que la coordination des niveaux d'activation/répression des promoteurs CDH1 et SNAIL1 est fortement liée à des mécanismes épigénétiques et post-transcriptionnels (par exemple liés au 3'-UTR ou à l'épissage) qui ne peuvent être enregistrés par les constructions plasmidiques contenant la séquence codante de la E-cadhérine sous le contrôle de régions promotrices virales.

A l'inverse, diverses études ont contribué à définir CK2 comme un activateur de la voie Wnt, notamment par l'intermédiaire d'une stabilisation de la protéine DVL responsable d'une inactivation de GSK3 $\beta$  et donc de la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine et de son association avec TCF/LEF (qui sont également des substrats de CK2).[739] Dans les cellules MCF10A invalidées pour CK2 $\beta$ , la  $\beta$ -caténine est majoritairement localisée dans le noyau, ce qui suggère que l'absence de sous-unités régulatrices n'a pas ou peu d'impact négatif sur les phosphorylations activatrices de la voie Wnt par CK2 $\alpha$ . Là encore, aucun de ses substrats n'a été étudié en considérant de façon isolée les différentes sous-unités de l'holoenzyme CK2 et une étude

biochimique approfondie s'avère nécessaire pour spéculer davantage sur l'implication de ces éléments dans notre modèle. Récemment, une boucle d'autorégulation positive faisant intervenir une coopération entre SNAIL1 et NF- $\kappa$ B a également été décrite il y a peu comme établissant un lien fonctionnel entre l'activation de SNAIL1 et l'induction de l'expression de gènes typiquement mésenchymateux tels que la vimentine.[495] CK2 agit à de multiples niveaux dans la voie NF- $\kappa$ B par une phosphorylation directe de IKK, p65-NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ -B dont la dépendance à CK2 $\beta$  n'a pas été non plus étudiée.[739]



**Figure 50 : Régulation de la signalisation de l'EMT : implication de la protéine-kinase CK2?**

Dans les cellules eucaryotes, CK2 est sans doute l'une des protéine-kinases les plus pléiotropiques et la compréhension de son fonctionnement *in vivo* reste un défi majeur même après plus de 40 ans de caractérisation biochimique. Les substrats de cette enzyme représentent près de 20% du phospho protéome et il existe malheureusement très peu de données sur la dépendance de leur phosphorylation vis-à-vis des sous-unités régulatrices CK2 $\beta$ . Dans cette étude, nous avons pu démontrer que l'ajout de phosphates par CK2 sur le domaine SRD du facteur de transcription SNAIL1 était favorisé par la formation de l'holoenzyme tétramérique  $\alpha_2\beta_2$  et était associée une déstabilisation protéique. Il est important de noter que ce schéma ne tient pas compte des éléments du cytosquelette qui participent à la structuration des jonctions adhérentes et peuvent moduler la transcription. Il existe en effet de nombreuses protéines associées à l'actine et aux microtubules qui sont phosphorylées par la protéine-kinase CK2 mais là encore avec peu d'informations sur les sous-unités régulatrices. De plus, les partenaires de CK2 $\beta$  indépendants de CK2 $\alpha$  ne sont pas représentés.



Pour finir, les diverses observations précédemment décrites ont pour la plupart été réalisées dans les cellules tumorales dans lesquelles l'activité et le niveau d'expression de CK2 est généralement plus élevé du fait de son action pléiotropique sur de nombreux substrats associés à la survie cellulaire et à la prolifération. Parmi ces protéines, on trouve notamment des régulateurs majeurs du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN ainsi que des complexes impliqués dans la modulation de la transcription et/ou de la traduction. Ainsi, les données s'accumulent pour spéculer sur les fonctions de «chaperonne métabolique» de CK2 dont les substrats (plus de 20% du protéome) pourraient être extrêmement variables en fonction du contexte cellulaire et dont l'expression serait contrôlée par des mécanismes «indépendants» de cette kinase.

## ***B. Régulation post-traductionnelle de la protéine SNAIL1***

*In vivo*, l'activation transcriptionnelle du promoteur *SNAIL* est *a priori* loin d'être un événement suffisant pour déclencher la répression des gènes sous le contrôle des E-box. En effet, à des niveaux d'expression modérés (c'est à dire en dehors des systèmes de surexpression dans les cellules en culture), la protéine SNAIL1 néo-synthétisée est soumise à des mécanismes de contrôles post-traductionnels qui en font une protéine fortement instable possédant une demi-vie de 20 à 45 minutes. La phosphorylation de son domaine central riche en sérines et prolines (SRD) permet de moduler à la fois sa liaison à l'ADN, sa localisation cellulaire et sa stabilité et implique à ce jour au moins trois protéine-kinases (CK1, CK2 et GSK3 $\beta$ ) et une phosphatase (SCP).[536, 663-665]

Chez l'humain, le domaine SRD de SNAIL1 abrite un motif de destruction DB de type DSGxxS qui, lorsqu'il est activé par phosphorylation, est reconnu par le complexe ubiquitine-ligase SCF/ $\beta$ -TrCP en association avec le protéasome. Dans les cellules épithéliales différenciées, la protéine GSK3 $\beta$  phosphoryle les résidus S<sup>96</sup> et S<sup>100</sup>, générant ainsi la séquence consensus DS<sup>P</sup>GxxS<sup>P</sup> qui agit comme signal de dégradation.[510-511, 666] La phosphorylation de ces sérines est fortement amplifiée par la kinase CK1 qui catalyse l'ajout de phosphates en position S<sup>104</sup> et S<sup>107</sup> (+4 et +7 par rapport au dernier résidu acide du site consensus).[667] Ces deux derniers résidus sont conservés dans la plupart des espèces étudiées à ce jour et il en est de même pour les sérines S<sup>82</sup>, S<sup>90</sup>, S<sup>92</sup>, S<sup>119</sup> et S<sup>120</sup> ainsi que pour la thréonine T<sup>89</sup>.

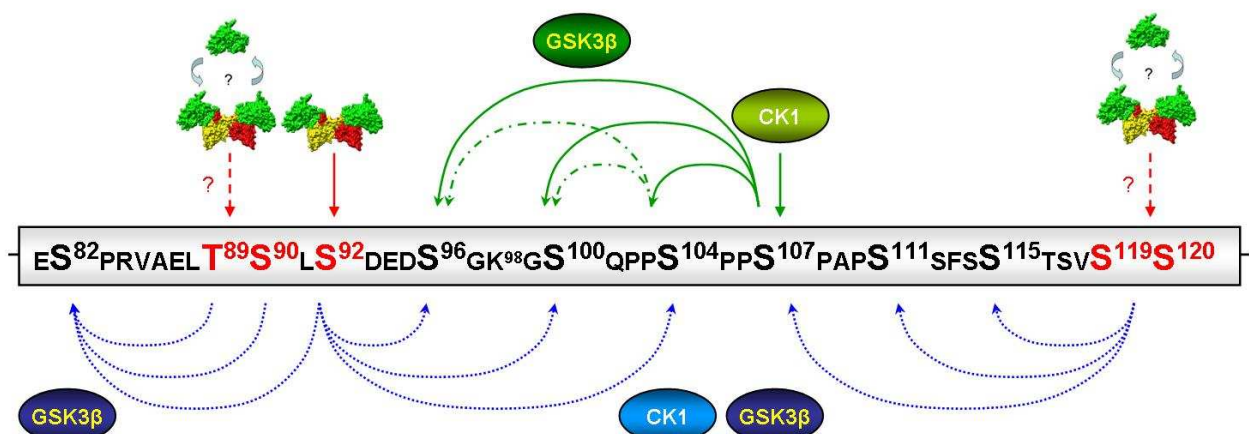
Cette étude propose un nouveau mécanisme dans lequel CK2 pourrait phosphoryler plusieurs de ces résidus dans le but d'enrichir le contexte acide du SRD et favoriser la phosphorylation par GSK3 $\beta$  (et éventuellement par CK1) suivie de la reconnaissance de SNAIL1 par le protéasome. Une telle coopération a déjà été démontrée dans la phosphorylation du domaine SRD de la glycogen-synthase (GS) ou du domaine EC de la E-cadhérine.[713-715, 719, 724-727] Dans ces deux contextes, on observe une succession de modifications post-traductionnelles qui se «propagent» de manière exponentielle en partant des résidus C-terminaux du domaine concerné. Si le «priming en position +3» s'avère être le plus efficace, plusieurs données biochimiques ont toutefois conduit à envisager des situations bien plus complexes dans lesquelles une pré-phosphorylation des résidus situés entre -10 et +10 pourraient aboutir à des changements conformationnels propices à la fixation de nouvelles protéines (enzymatiques ou non).[416-417, 514]

Dans le cas de la protéine SNAIL1, on peut noter que l'ubiquitine-ligase  $\beta$ -TrCP reconnaît le motif DSGKGS renfermant les acides aminés 95 à 100 et que cette fixation lui permet de modifier la lysine K<sup>98</sup> mais aussi un autre résidu éloigné : la lysine K<sup>137</sup>. [536]

Par une approche utilisant le séquençage d'Edman, le laboratoire d'Amparo Cano à Madrid a récemment mis en évidence une phosphorylation des sérines S<sup>11</sup>, S<sup>82</sup> et S<sup>92</sup> dans les cellules rénales MDCK. [668]

Des travaux réalisés dans l'équipe du Dr Jérôme Garin (CEA Grenoble) ont amené une confirmation par spectrométrie de masse de la phosphorylation *in vitro* du résidu S<sup>92</sup> par la protéine-kinase CK2 ; nous avons également mis en évidence l'implication de la sous-unité régulatrice CK2 $\beta$  dans ce phénomène. Si la kinase PKA a été identifiée comme responsable de la phosphorylation de la sérine S<sup>11</sup>, l'enzyme associée à la régulation du résidu S<sup>82</sup> demeure inconnue à ce jour. Une analyse de la séquence humaine de SNAIL1 grâce au serveur NetPhosK1.0 m'a permis d'établir une «carte prédictive» des sérines et thréonines potentiellement reconnues par un panel de kinases dont les sites consensus sont relativement bien caractérisés. Avec un score de probabilité supérieur à 40%, j'ai pu observer que la plupart des données de la littérature pouvaient être confirmées par cette approche et que le meilleur candidat pour la phosphorylation en position S<sup>82</sup> était la kinase GSK3 $\beta$ . Ainsi, les résidus T<sup>89</sup>, S<sup>90</sup> et S<sup>92</sup> prédits pour être reconnus par CK2 pourraient être de bons candidats pour un «priming» permettant cette modification post-traductionnelle. Il est également fortement envisageable qu'ils favorisent la reconnaissance des acides aminés S<sup>96</sup>, S<sup>100</sup> et S<sup>104</sup> par GSK3 $\beta$  et CK1. Enfin, cette analyse démontre également que la plupart des sérines et thréonines du domaine SRD peuvent être reconnues par CK1, CK2 et GSK3 $\beta$  avec des scores relativement similaires, suggérant une activité redondante et/ou une coopération entre ces trois kinases.

Jusqu'ici, seules des approches de mutagenèse locale de SNAIL1 et l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou oligonucléotidiques dirigés contre ses régulateurs ont pu éclairer la régulation complexe de cette protéine. Dans un futur proche, l'émergence de techniques plus performantes couplant l'utilisation d'anticorps «phosphosite-spécifiques» avec la spectrométrie de masse à l'échelle de la cellule ou de l'organisme permettra probablement de mieux aborder cette question.



**Figure 51 : Modèle de régulation du domaine SRD de SNAIL1 par les kinases CK1, CK2 et GSK3 $\beta$ .**

D'après une analyse prédictive du domaine SRD de la protéine SNAIL1, il semble que CK2 puisse phosphoryler cinq résidus S/T répartis en deux «clusters» (en rouge). Comme dans le cas de la coopération entre CK1 et GSK3 $\beta$  (en vert), il est envisageable que la phosphorylation du SRD par CK2 puisse générer un contexte acide favorable à d'autres phosphorylations par GSK3 $\beta$  et éventuellement par CK1. Ces modifications sont représentées par les flèches bleues qui sont pour l'instant purement spéculatives.

### C. *Perspectives in vivo*

La mise en place de l'EMT est un élément déterminant dans l'apparition du caractère invasif de nombreuses tumeurs. Depuis quelques années, plusieurs laboratoires en partenariat avec l'industrie pharmaceutique, cherchent à développer des drogues capables de bloquer les étapes indispensables à cette transition.[138, 536] L'unité INSERM dans laquelle ce projet a été initié est depuis plusieurs années financée par la Ligue contre le Cancer pour le développement d'inhibiteurs dirigés contre la kinase CK2, ceux-ci s'avérant être de puissants outils contre la prolifération de diverses lignées transformées.

Dans une optique d'utilisation de ces inhibiteurs pour une application thérapeutique, une étude complète des mécanismes ciblés s'avère donc indispensable du fait du caractère polyfonctionnel de CK2 et de la complexité de l'évolution tumorale. En effet, l'accumulation de nombreuses données a permis de définir un modèle dans lequel la progression oncogénique ne peut plus être réduite à un simple déficit de la balance apoptose/prolifération mais correspondrait plutôt à l'accumulation séquentielle et exponentielle de diverses anomalies génétiques et épigénétiques nécessaires aux «succès» de la croissance des tumeurs et de l'invasion métastatique (modèle multi-hit). Sur la base des données établies par cette étude dans la lignée non transformée MCF10A, il serait intéressant d'explorer *in vivo* l'impact de l'inhibition de l'activité catalytique et/ou de l'assemblage de l'hétérotétramère CK2 $\alpha_2\beta_2$  sur l'expression de SNAIL1 et la morphologie des cellules épithéliales normales et transformées.

Enfin, les dernières années ont été déterminantes dans la compréhension des gènes et des voies de signalisation qui font le lien entre l'embryogenèse et des processus intervenant dans le développement physiologique et pathologique des cellules adultes. L'EMT, en coordonnant à la fois la migration des cellules épithéliales primaires et la dispersion des cellules transformées qui composent les carcinomes est un des exemples qui illustrent cette «réactivation» des programmes développementaux dans les phénomènes oncogéniques. Il existe actuellement plusieurs modèles animaux très performants pour l'étude de l'EMT associée au développement embryonnaire (en particulier *Danio rerio* et *Xenopus laevis*) et, dans ce contexte, il serait pertinent d'étudier les effets de l'«invalidation génique partielle par ARN interférence» des différentes sous-unités de la kinase CK2. Plusieurs études récentes ont en effet démontré l'efficacité des systèmes de transduction stable utilisant des lentivirus pseudotypés et les outils développés au cours de mon doctorat pourraient se révéler particulièrement intéressants dans le cadre d'une telle approche.

## *Références bibliographiques*



1. Thiery, J.P. and D. Chopin, *Epithelial cell plasticity in development and tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 1999. **18**(1): p. 31-42.
2. Rodriguez-Boulán, E., A. Musch, and A. Le Bivic, *Epithelial trafficking: new routes to familiar places*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 436-42.
3. Tanos, B. and E. Rodriguez-Boulán, *The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6939-6957.
4. Cichowski, K., M.J. Orsini, and L.F. Brass, *PAR1 activation initiates integrin engagement and outside-in signalling in megakaryoblastic CHRF-288 cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1999. **1450**(3): p. 265-276.
5. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 629-635.
6. Rodriguez-Boulán, E., G. Kreitzer, and A. Musch, *Organization of vesicular trafficking in epithelia*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(3): p. 233-47.
7. Wu, Y. and B.P. Zhou, *New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2008. **40**(7): p. 643-650.
8. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. **7**(2): p. 131-142.
9. Forcet, C. and M. Billaud, *Dialogue between LKB1 and AMPK: a hot topic at the cellular pole*. Science Signaling, 2007. **2007**(404).
10. Viollet, B., et al., *AMPK inhibition in health and disease*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, (00): p. 1-20.
11. Martin-Belmonte, F. and K. Mostov, *Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis*. Current opinion in cell biology, 2008. **20**(2): p. 227-234.
12. Jamora, C. and E. Fuchs, *Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(4): p. E101-8.
13. Schock, F. and N. Perrimon, *Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 463-93.
14. Lodish, H.F. and A. Berk, *Molecular cell biology*. 2008: WH Freeman.
15. Amann, K.J. and T.D. Pollard, *Cellular regulation of actin network assembly*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. R728-30.
16. Theriot, J.A., *Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton*. J Cell Biol, 1997. **136**(6): p. 1165-8.
17. Pak, C.W., K.C. Flynn, and J.R. Bamberg, *Actin-binding proteins take the reins in growth cones*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(2): p. 136-47.
18. Blanchoin, L., T.D. Pollard, and R.D. Mullins, *Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1273-82.
19. Quinlan, M.E., et al., *Drosophila Spire is an actin nucleation factor*. Nature, 2005. **433**(7024): p. 382-8.
20. Pechlivanis, M., A. Samol, and E. Kerkhoff, *Identification of a short Spir interaction sequence at the C-terminal end of formin subgroup proteins*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 25324-33.
21. Pollard, T.D., *Formins initiate new actin filaments*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(8): p. E191.
22. Harris, E.S., F. Li, and H.N. Higgs, *The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20076-87.
23. Kobiela, A., H.A. Pasolli, and E. Fuchs, *Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(1): p. 21-30.
24. McGough, A., *F-actin-binding proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(2): p. 166-76.
25. Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins, *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 545-76.
26. Cameron, L.A., et al., *Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 110-9.
27. Cooper, J.A. and D.A. Schafer, *Control of actin assembly and disassembly at filament ends*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 97-103.
28. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Pub, 1994.
29. Bartles, J.R., *Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins*. Current opinion in cell biology, 2000. **12**(1): p. 72-78.
30. Vasioukhin, V. and E. Fuchs, *Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia*. Current opinion in cell biology, 2001. **13**(1): p. 76-84.
31. Conti, M.A. and R.S. Adelstein, *Nonmuscle myosin II moves in new directions*. Journal of cell science, 2008. **121**(1): p. 11.
32. Yonemura, S., et al., *Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells*. Journal of cell science, 1995. **108**(1): p. 127.
33. Glenney, J.R., P. Glenney, and K. Weber, *The spectrin-related molecule, TW-260/240, cross-links the actin bundles of the microvillus rootlets in the brush borders of intestinal epithelial cells*. The Journal of cell biology, 1983. **96**(5): p. 1491.
34. Yamada, S. and W.J. Nelson, *Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion*. The Journal of cell biology, 2007. **178**(3): p. 517.
35. Kaibuchi, K., *Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by Rho targets*. Prog Mol Subcell Biol, 1999. **22**: p. 23-38.
36. Vasioukhin, V., et al., *Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion*. Cell, 2000. **100**(2): p. 209-219.
37. Higgs, H.N. and T.D. Pollard, *Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex*. J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1311-20.
38. Nobes, C.D., et al., *A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion*. J Cell Biol, 1998. **141**(1): p. 187-97.
39. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility*. Biochem Soc Trans, 1995. **23**(3): p. 456-9.
40. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers*,

- lamellipodia, and filopodia*. Cell, 1995. **81**(1): p. 53-62.
41. Seasholtz, T.M., et al., *Rho-mediated cytoskeletal rearrangement in response to LPA is functionally antagonized by Rac1 and PIP2*. J Neurochem, 2004. **91**(2): p. 501-12.
  42. Ozdamar, B., et al., *Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1603-9.
  43. Akhmanova, A. and C.C. Hoogenraad, *Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions*. Current opinion in cell biology, 2005. **17**(1): p. 47-54.
  44. Ligon, L.A., et al., *Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(10): p. 913-7.
  45. Cheeseman, I.M. and A. Desai, *Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 33-46.
  46. Thery, M. and M. Bornens, *[Cell adhesion guides cell polarity]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(3): p. 230-2.
  47. Thery, M., et al., *Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 493-6.
  48. Ren, X.D., W.B. Kiosses, and M.A. Schwartz, *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton*. The EMBO Journal, 1999. **18**(3): p. 578-585.
  49. Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi, *Regulation of microtubules in cell migration*. Trends in cell biology, 2005. **15**(2): p. 76-83.
  50. Rodriguez, O.C., et al., *Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(7): p. 599-609.
  51. Rodriguez, O.C., et al., *Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis*. Nature Cell Biology, 2003. **5**(7): p. 599-609.
  52. Wiche, G., *Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics*. Journal of cell science, 1998. **111**(17): p. 2477.
  53. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.
  54. Schweizer, J., et al., *New consensus nomenclature for mammalian keratins*. The Journal of cell biology, 2006. **174**(2): p. 169.
  55. Bridger, J.M., et al., *The nuclear lamina*. Febs Journal, 2007. **274**(6): p. 1354-1361.
  56. Perkins, W., et al., *Keratin expression in normal skin and epidermal neoplasms demonstrated by a panel of monoclonal antibodies*. Journal of cutaneous pathology, 1992. **19**(6): p. 476-482.
  57. Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi, *Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions\* 1*. Journal of structural biology, 1998. **122**(1-2): p. 42-66.
  58. Paramio, J.M. and J.L. Jorcano, *Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling?* Bioessays, 2002. **24**(9): p. 836-844.
  59. Leung, C.L., K.J. Green, and R.K. Liem, *Plakins: a family of versatile cytolinker proteins*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(1): p. 37-45.
  60. Herrmann, H., et al., *Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(7): p. 562-573.
  61. Boyer, B. and J.P. Thiery, *Epithelial cell adhesion mechanisms*. J Membr Biol, 1989. **112**(2): p. 97-108.
  62. Jefferson, J.J., C.L. Leung, and R.K.H. Liem, *Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004. **5**(7): p. 542-553.
  63. Brandner, J.M., *Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **72**(2): p. 289-294.
  64. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(11): p. 2525-2532.
  65. Furuse, M., et al., *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier*. The Journal of cell biology, 2002. **156**(6): p. 1099.
  66. Tepass, U., *Claudin complexities at the apical junctional complex*. Nature Cell Biology, 2003. **5**(7): p. 595-597.
  67. Niessen, C.M. and C.J. Gottardi, *Molecular components of the adherens junction*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2008. **1778**(3): p. 562-571.
  68. Shimoyama, Y., et al., *Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas*. Cancer research, 1989. **49**(8): p. 2128.
  69. Van Roy, F. and G. Berx, *The cell-cell adhesion molecule E-cadherin*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(23): p. 3756-3788.
  70. Takeichi, M., *Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins*. The Journal of cell biology, 1977. **75**(2): p. 464.
  71. Suzuki, S.T., *Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily*. Journal of Cell Science, 1996. **109**(11): p. 2609.
  72. Blaschuk, O.W., et al., *Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence\* 1*. Developmental biology, 1990. **139**(1): p. 227-229.
  73. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Annual review of biochemistry, 1990. **59**(1): p. 237-252.
  74. Tanihara, H., et al., *Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin*. Cell Communication & Adhesion, 1994. **2**(1): p. 15-26.
  75. Rasbridge, S.A., et al., *Epithelial (E-) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma*. The Journal of pathology, 1993. **169**(2): p. 245-250.
  76. Shimoyama, Y. and S. Hirohashi, *Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas*. Cancer research, 1991. **51**(8): p. 2185.
  77. Cowin, P., D. Matthey, and D. Garrod, *Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'*. Journal of cell science, 1984. **70**(1): p. 41.
  78. Koch, P.J., et al., *Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules*. European journal of cell biology, 1990. **53**(1): p. 1.



79. Nakajima, D., et al., *Identification of three novel non-classical cadherin genes through comprehensive analysis of large cDNAs*. Molecular Brain Research, 2001. **94**(1-2): p. 85-95.
80. Huber, A.H. and W.I. Weis, *The structure of the [beta]-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by [beta]-catenin*. Cell, 2001. **105**(3): p. 391-402.
81. Shapiro, L., et al., *Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins*. 1995.
82. Semb, H., *Cadherins in Development*. Cell Adhesion, 2004: p. 53-68.
83. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. International Journal of Developmental Biology, 2004. **48**: p. 365-376.
84. Harris, T.J.C. and U. Tepass, *Adherens junctions: from molecules to morphogenesis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology. **11**(7): p. 502-514.
85. Kobiela, A. and E. Fuchs, *Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2004. **5**(8): p. 614.
86. Kawajiri, A., et al., *Identification of a novel beta-catenin-interacting protein*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **273**(2): p. 712.
87. Yamada, S., et al., *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex*. Cell, 2005. **123**(5): p. 889-901.
88. Kaibuchi, K., et al., *Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(5): p. 591-6.
89. Bailly, M., *Connecting cell adhesion to the actin polymerization machinery: vinculin as the missing link?* Trends in cell biology, 2003. **13**(4): p. 163-165.
90. Kuroda, S., et al., *Cdc42, Rac1, and their effector IQGAP1 as molecular switches for cadherin-mediated cell-cell adhesion*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **262**(1): p. 1-6.
91. Briggs, M.W. and D.B. Sacks, *IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation*. EMBO Rep, 2003. **4**(6): p. 571-4.
92. Rudini, N., et al., *Adherens junctions*. Curr. Biol, 2008. **18**: p. R1080-R1082.
93. Peifer, M., et al., *The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties*. The Journal of cell biology, 1992. **118**(3): p. 681.
94. McCrea, P.D., C.W. Turck, and B. Gumbiner, *A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1359.
95. Huber, A.H., W.J. Nelson, and W.I. Weis, *Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of [beta]-catenin*. Cell, 1997. **90**(5): p. 871-882.
96. Perez-Moreno, M. and E. Fuchs, *Catenins: keeping cells from getting their signals crossed*. Developmental cell, 2006. **11**(5): p. 601-612.
97. Huber, O., C. Bierkamp, and R. Kemler, *Cadherins and catenins in development*. Current opinion in cell biology, 1996. **8**(5): p. 685-691.
98. Fuchs, E. and S. Raghavan, *Getting under the skin of epidermal morphogenesis*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(3): p. 199-209.
99. Garrod, D.R., A.J. Merritt, and Z. Nie, *Desmosomal cadherins*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 537-45.
100. Legan, P.K., J.E. Collins, and D.R. Garrod, *The molecular biology of desmosomes and hemidesmosomes: "what's in a name"?* Bioessays, 1992. **14**(6): p. 385-93.
101. Garrod, D.R., A.J. Merritt, and Z. Nie, *Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation (Review)*. Mol Membr Biol, 2002. **19**(2): p. 81-94.
102. Kottke, M.D., E. Delva, and A.P. Kowalczyk, *The desmosome: cell science lessons from human diseases*. Journal of cell science, 2006. **119**(5): p. 797.
103. Angst, B.D., L.A. Nilles, and K.J. Green, *Desmoplakin II expression is not restricted to stratified epithelia*. Journal of cell science, 1990. **97**(2): p. 247.
104. Cowin, P., H.P. Kapprell, and W.W. Franke, *The complement of desmosomal plaque proteins in different cell types*. The Journal of cell biology, 1985. **101**(4): p. 1442.
105. Maass, K., et al., *Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(10): p. 4597-608.
106. Darnell, J., H. Lodish, and D. Baltimore, *Molecular cell biology*. 1986.
107. Yurchenco, P.D. and J.C. Schittny, *Molecular architecture of basement membranes*. The FASEB Journal, 1990. **4**(6): p. 1577.
108. Chan, L.S., et al., *A Newly Identified 105-kD Lower Lamina Lucida Autoantigen Is an Acidic Protein Distinct from the 105-kD [gamma]2 Chain of Laminin-5*. J Investig Dermatol, 1995. **105**(1): p. 75-79.
109. Tunggal, P., et al., *Laminins: structure and genetic regulation*. Microscopy Research and Technique, 2000. **51**(3): p. 214-227.
110. Burgeson, R.E., et al., *A new nomenclature for the laminins*. Matrix Biology, 1994. **14**(3): p. 209-211.
111. LeBleu, V.S., B. MacDonald, and R. Kalluri, *Structure and function of basement membranes*. Experimental Biology and Medicine, 2007. **232**(9): p. 1121.
112. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-433.
113. Tozeren, A., et al., *Integrin alpha 6 beta 4 mediates dynamic interactions with laminin*. Journal of cell science, 1994. **107**(11): p. 3153.
114. Watt, F.M., *Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation*. The EMBO Journal, 2002. **21**(15): p. 3919-3926.
115. Gilcrease, M.Z., *Integrin signaling in epithelial cells*. Cancer letters, 2007. **247**(1): p. 1-25.
116. Wiesner, S., K.R. Legate, and R. Fassler, *Integrin-actin interactions*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005. **62**(10): p. 1081-1099.
117. Yeatman, T.J., *A renaissance for SRC*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(6): p. 470-480.
118. Kern, A. and E.E. Marcantonio, *Role of the I domain in collagen binding specificity and activation of the integrins 1 1 and 2 1*. Journal of cellular physiology, 1998. **176**(3): p. 634-641.
119. Carter, W.G., et al., *The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells*. The Journal of cell biology, 1990. **110**(4): p. 1387.

120. Kreidberg, J.A., et al., *Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis*. Development, 1996. **122**(11): p. 3537.
121. DiPersio, C.M., et al., *3 1 integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane*. The Journal of cell biology, 1997. **137**(3): p. 729.
122. Weiss, P. and R. James, *Skin metaplasia in vitro induced by brief exposure to vitamin A*. Experimental cell research, 1955(Suppl 3): p. 381.
123. Lardon, J. and L. Bouwens, *Metaplasia in the pancreas*. Differentiation, 2005. **73**(6): p. 278-286.
124. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1429.
125. Jouanneau, J., et al., *Epithelial cell plasticity in neoplasia*. Cancer Cells, 1991. **3**(12): p. 525-9.
126. Weber, G. and M.A. Lea, *The molecular correlation concept of neoplasia*. Advances in Enzyme Regulation, 1966. **4**: p. 115-145.
127. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nature medicine, 1998. **4**(7): p. 844-847.
128. Klymkowsky, M.W. and P. Savagner, *Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe*. American Journal of Pathology, 2009. **174**(5): p. 1588.
129. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1420.
130. Savagner, P., *Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition*. Bioessays, 2001. **23**(10): p. 912-923.
131. Acloque, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1438.
132. Hay, E.D., *Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo*. Baltimore, Williams and Wilkins. **1568**: p. 31-55.
133. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. The Journal of cell biology, 1982. **95**(1): p. 333.
134. Bolender, D.L. and R.R. Markwald, *Epithelial-mesenchymal transformation in chick atrioventricular cushion morphogenesis*. Scanning electron microscopy, 1979(3): p. 313.
135. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. The Journal of cell biology, 2006. **172**(7): p. 973.
136. Revenu, C. and D. Gilmour, *EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration*. Current opinion in genetics & development, 2009. **19**(4): p. 338-342.
137. Kalluri, R., *EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1417.
138. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-890.
139. Fata, J.E., Z. Werb, and M.J. Bissell, *Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(1): p. 1-11.
140. Debnath, J. and J.S. Brugge, *Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(9): p. 675-688.
141. Côme, C., et al., *Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2004. **9**(2): p. 183-193.
142. Demir, A.Y., et al., *Menstrual effluent induces epithelial-mesenchymal transitions in mesothelial cells*. Human Reproduction, 2004. **19**(1): p. 21.
143. Sadler, T.W. and J. Langman, *Langman's essential medical embryology*. 2004: Lippincott Williams & Wilkins.
144. Larue, L. and A. Bellacosa, *Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3 kinase/AKT pathways*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7443-7454.
145. Larue, L., et al., *E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(17): p. 8263.
146. Vicovac, L. and J.D. Aplin, *Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation*. Cells Tissues Organs, 1996. **156**(3): p. 202-216.
147. Martindale, M.Q., K. Pang, and J.R. Finnerty, *Investigating the origins of triploblasty: mesodermal gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone Nematostella vectensis (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa)*. Development, 2004. **131**(10): p. 2463.
148. Eakin, G.S. and R.R. Behringer, *Gastrulation in other mammals and humans*. Gastrulation. From cells to embryo. CD Stern, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA, 2004: p. 275-287.
149. Dvash, T., et al., *Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies*. Human Reproduction, 2004. **19**(12): p. 2875.
150. Denker, H.W., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition in Rhesus Monkey Embryonic Stem Cell Colonies: A Model for Processes Involved in Gastrulation?* Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 48-50.
151. Eastham, A.M., et al., *Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation*. Cancer research, 2007. **67**(23): p. 11254.
152. Kokkinos, M.I., et al., *Cadherins in the human placenta - epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development*. Placenta.
153. Haeckel, E., *Die Kalkschwämme... Von Ernst Haeckel*. 1872: G. Reimer.
154. His, W., *Die Entwicklung der ersten Nervenbahnen beim menschlichen Embryo. Uebersichtliche Darstellung*. Archiv für Anatomie und Entwicklungsgeschichte, 1887: p. 368.
155. Hörstadius, S., *The neural crest: its properties and derivatives in the light of experimental research*. 1950: Oxford University Press.
156. Mulnard, J., *Enzymes in ontogenesis: acid and alkaline phosphomonoesterases in the development of the rat and mouse*. Archives de biologie, 1955. **66**(4): p. 525.
157. Sauka-Spengler, T. and M. Bronner-Fraser, *Evolution of the neural crest viewed from a gene regulatory perspective*. genesis, 2008. **46**(11): p. 673-682.

158. Poswillo, D., *Causal mechanisms of craniofacial deformity*. British Medical Bulletin, 1975. **31**(2): p. 101.
159. Poswillo, D., *The aetiology and pathogenesis of craniofacial deformity*. Development, 1988. **103**(Supplement): p. 207.
160. Bianco, A., et al., *Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 362-365.
161. Dale, J.K., et al., *Oscillations of the snail genes in the presomitic mesoderm coordinate segmental patterning and morphogenesis in vertebrate somitogenesis*. Developmental cell, 2006. **10**(3): p. 355-366.
162. Buckingham, M., et al., *The formation of skeletal muscle: from somite to limb*. Journal of Anatomy, 2003. **202**(1): p. 59-68.
163. Gros, J., et al., *A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 954-958.
164. Nakajima, Y., et al., *Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: Roles of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  and bone morphogenetic protein (BMP)*. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2000. **258**(2): p. 119-127.
165. Rivera-Feliciano, J., et al., *Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells*. Development, 2006. **133**(18): p. 3607.
166. Johansson, K.A. and A. Grapin-Botton, *Development and diseases of the pancreas*. Clinical genetics, 2002. **62**(1): p. 14-23.
167. Tanimizu, N. and A. Miyajima, *Molecular mechanism of liver development and regeneration*. International review of cytology, 2007. **259**: p. 1-48.
168. Ahmed, S., C.C. Liu, and A. Nawshad, *Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF)  $\beta$* . Developmental biology, 2007. **309**(2): p. 193-207.
169. Zhan, Y., et al., *Mullerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression*. Development, 2006. **133**(12): p. 2359.
170. Radisky, D.C., P.A. Kenny, and M.J. Bissell, *Fibrosis and cancer: Do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?* Journal of cellular biochemistry, 2007. **101**(4): p. 830-839.
171. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(12): p. 1776-1784.
172. Savagner, P., et al., *La plasticité cellulaire: de l'embryon à la fibrose et au cancer*. Bulletin de l'Académie nationale de médecine, 2009. **193**(9): p. 1981-1992.
173. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(5): p. 349-363.
174. Radisky, D.C. and J.A. Przybylo, *Matrix metalloproteinase-induced fibrosis and malignancy in breast and lung*. 2008: Am Thoracic Soc.
175. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(3): p. 341-350.
176. Bissell, D.M., *Chronic liver injury, TGF- $\beta$ , and cancer*. Experimental and molecular medicine, 2001. **33**(4): p. 179-190.
177. Boyd, N.F., et al., *Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer*. The lancet oncology, 2005. **6**(10): p. 798-808.
178. Rastaldi, M.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies*. Kidney international, 2002. **62**(1): p. 137-146.
179. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Cytodifferentiation and tissue phenotype change during transformation of embryonic lens epithelium to mesenchyme-like cells in vitro\* 1*. Developmental biology, 1986. **115**(2): p. 363-379.
180. Tarin, D., E.W. Thompson, and D.F. Newgreen, *The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia*. Cancer research, 2005. **65**(14): p. 5996.
181. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, *Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?* Cancer research, 2005. **65**(14): p. 5991.
182. Christiansen, J.J. and A.K. Rajasekaran, *Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis*. Cancer research, 2006. **66**(17): p. 8319.
183. Trimboli, A.J., et al., *Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer*. Cancer research, 2008. **68**(3): p. 937.
184. Condeelis, J. and J.E. Segall, *Intravital imaging of cell movement in tumours*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(12): p. 921-930.
185. Reckamp, K.L., et al., *Tumor response to combination celecoxib and erlotinib therapy in non-small cell lung cancer is associated with a low baseline matrix metalloproteinase-9 and a decline in serum-soluble E-cadherin*. Journal of Thoracic Oncology, 2008. **3**(2): p. 117.
186. Hu, S., et al., *Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2004. **287**(5): p. C1184.
187. Ingber, D.E., *Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again*. The FASEB Journal, 2006. **20**(7): p. 811.
188. Kim, S. and P.A. Coulombe, *Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology. **11**(1): p. 75-81.
189. Olson, E.N. and A. Nordheim, *Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions*. Nat Rev Mol Cell Biol. **11**(5): p. 353-65.
190. Dressler, G.R., *The cellular basis of kidney development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 509-29.
191. Oreffo, R.O., et al., *Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential*. Stem Cell Rev, 2005. **1**(2): p. 169-78.
192. Koseki, C., D. Herzlinger, and Q. al-Awqati, *Apoptosis in metanephric development*. J Cell Biol, 1992. **119**(5): p. 1327-33.
193. Dressler, G.R., *The cellular basis of kidney development*. 2006.
194. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1807-16.

195. Bucala, R., et al., *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. Mol Med, 1994. **1**(1): p. 71-81.
196. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
197. Quan, T.E., S.E. Cowper, and R. Bucala, *The role of circulating fibrocytes in fibrosis*. Current rheumatology reports, 2006. **8**(2): p. 145-150.
198. Adzick, N.S. and M.T. Longaker, *Animal models for the study of fetal tissue repair*. Journal of Surgical Research, 1991. **51**(3): p. 216-222.
199. Liu, H.W., F.A. Ofosu, and P.L. Chang, *Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts*. Human Gene Therapy, 1993. **4**(3): p. 291-301.
200. Palmieri, C., et al., *The expression of oestrogen receptor (ER)-beta and its variants, but not ERalpha, in adult human mammary fibroblasts*. Journal of molecular endocrinology, 2004. **33**(1): p. 35.
201. Rinn, J.L., et al., *Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs*. PLoS Genet, 2006. **2**(7): p. e119.
202. Paunescu, V., et al., *Tumor-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences*. J Cell Mol Med. 2010 Feb 24.
203. Neilson, E.G., *Mechanisms of disease: fibroblasts—a new look at an old problem*. Nature Clinical Practice Nephrology, 2006. **2**(2): p. 101-108.
204. Strutz, F., *The fibroblast—a (trans-) differentiated cell?* Nephrology Dialysis Transplantation, 1995. **10**(9): p. 1504.
205. Khatau, S.B., et al., *A perinuclear actin cap regulates nuclear shape*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(45): p. 19017.
206. Sappino, A.P., W. Schurch, and G. Gabbiani, *Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations*. Lab Invest, 1990. **63**(2): p. 144-61.
207. Strutz, F., et al., *Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1*. Journal of Cell Biology, 1995. **130**(2): p. 393.
208. Li, Z.H. and A.R. Bresnick, *The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA*. Cancer research, 2006. **66**(10): p. 5173.
209. Jenkinson, S.R., et al., *S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis*. British journal of cancer, 2004. **90**(1): p. 253-262.
210. Barraclough, R., *Calcium-binding protein S100A4 in health and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1998. **1448**(2): p. 190-199.
211. Mazzucchelli, L., *Protein S100A4: too long overlooked by pathologists?* American Journal of Pathology, 2002. **160**(1): p. 7.
212. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Developmental Dynamics, 2005. **233**(3): p. 706-720.
213. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57.
214. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(12): p. 895-902.
215. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nature Reviews Cancer, 2008. **9**(4): p. 239-252.
216. Sell, S. and G.B. Pierce, *Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1994. **70**(1): p. 6.
217. Morel, A.P., et al., *Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition*. PLoS One, 2008. **3**(8).
218. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-715.
219. Bhowmick, N.A. and H.L. Moses, *Tumor-stroma interactions*. Current opinion in genetics & development, 2005. **15**(1): p. 97-101.
220. Sappino, A.P., et al., *Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells*. Am J Pathol, 1990. **137**(3): p. 585-91.
221. Willis, R.A., *The unusual in tumour pathology*. Can Med Assoc J, 1967. **97**(24): p. 1466-79.
222. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
223. Olumi, A.F., et al., *Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium*. Cancer research, 1999. **59**(19): p. 5002.
224. Kurose, K., et al., *Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas*. Nature genetics, 2002. **32**(3): p. 355-357.
225. Wernert, N., et al., *Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers*. Anticancer Res, 2001. **21**(4A): p. 2259-64.
226. Ramaswamy, S., et al., *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. Nature genetics, 2002. **33**(1): p. 49-54.
227. Koop, S., et al., *Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11080-4.
228. Varghese, H.J., et al., *Activated ras regulates the proliferation/apoptosis balance and early survival of developing micrometastases*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 887-91.
229. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-454.
230. Fidler, I.J. and M.L. Kripke, *Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor*. Science, 1977. **197**: p. 893-895.
231. Fidler, I.J., D.M. Gersten, and I.R. Hart, *The biology of cancer invasion and metastasis*. Advances in cancer research, 1978. **28**: p. 149-250.
232. Merlo, L.M., et al., *Cancer as an evolutionary and ecological process*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(12): p. 924-35.
233. Marotta, L.L.C. and K. Polyak, *Cancer stem cells: a model in the making*. Current opinion in genetics & development, 2009. **19**(1): p. 44-50.
234. Ullmann, U., et al., *Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions*. Molecular human reproduction, 2007. **13**(1): p. 21.

235. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-872.
236. Monteiro, J. and R. Fodde, *Cancer stemness and metastasis: Therapeutic consequences and perspectives*. European journal of cancer (Oxford, England: 1990).
237. Gupta, P.B., C.L. Chaffer, and R.A. Weinberg, *Cancer stem cells: mirage or reality?* Nature medicine, 2009. **15**(9): p. 1010-1012.
238. Berx, G., et al., *Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer*. Clinical and Experimental Metastasis, 2007. **24**(8): p. 587-597.
239. Al-Hajj, M. and M.F. Clarke, *Self-renewal and solid tumor stem cells*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7274-82.
240. Wicha, M.S., S. Liu, and G. Dontu, *Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 1883-90; discussion 1895-6.
241. Sheu, B.C., et al., *A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression*. Cancer research, 2001. **61**(1): p. 237.
242. Voulgari, A. and A. Pintzas, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2009. **1796**(2): p. 75-90.
243. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 313-323.
244. Hermann, P.C., et al., *Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity*. Cell transplantation, 2007. **16**(10): p. 1059-1069.
245. Invest, J.C., et al., 1. Paget S: *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. Lancet, 1889. **1**: p. 571-572.
246. Ribatti, D., G. Mangialardi, and A. Vacca, *Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination*. Clinical and Experimental Medicine, 2006. **6**(4): p. 145-149.
247. Liotta, L.A., J. Kleinerman, and G.M. Saldel, *The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process*. Cancer research, 1976. **36**(3): p. 889.
248. Mehes, G., et al., *Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic*. American Journal of Pathology, 2001. **159**(1): p. 17.
249. Bockhorn, M., R.K. Jain, and L.L. Munn, *Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?* The lancet oncology, 2007. **8**(5): p. 444-448.
250. Fidler, I.J., *Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumour emboli labelled with 125 I-5-iodo-2-deoxyuridine*, JNCI 45 (1970). View Record in Scopus| Cited By in Scopus (232): p. 773.
251. Kang, Y., et al., *A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone*. Cancer cell, 2003. **3**(6): p. 537-549.
252. Minn, A.J., et al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to lung*. Nature, 2005. **436**(7050): p. 518-524.
253. Wendt, M.K., T.M. Allington, and W.P. Schieman, *Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF*. Future Oncology, 2009. **5**(8): p. 1145-1168.
254. Wells, A., C. Yates, and C.R. Shepard, *E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas*. Clinical and Experimental Metastasis, 2008. **25**(6): p. 621-628.
255. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. Cells Tissues Organs, 1995. **154**(1): p. 8-20.
256. Behrens, J., et al., *Cell adhesion in invasion and metastasis*. Semin Cell Biol, 1992. **3**(3): p. 169-78.
257. Shook, D. and R. Keller, *Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development*. Mechanisms of development, 2003. **120**(11): p. 1351-1383.
258. Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, and A. Ben-Ze'ev, *The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **109**(8): p. 987-991.
259. Onder, T.T., et al., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. Cancer research, 2008. **68**(10): p. 3645.
260. Vleminckx, K. and L. Vakaet, *Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role*. Cell, 1991. **66**(1): p. 107-119.
261. Thiery, J.P. and M. Morgan, *Breast cancer progression with a Twist*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 777-8.
262. Birchmeier, W. and J. Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. Biochimica et biophysica acta, CR. Reviews on cancer, 1994. **1198**(1): p. 11-26.
263. Gupta, P.B., et al., *Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening*. Cell, 2009. **138**(4): p. 645-659.
264. Behrens, J., et al., *Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion*. Journal of Cell Biology, 1989. **108**(6): p. 2435.
265. Semb, H. and G. Christofori, *The tumor-suppressor function of E-cadherin*. American journal of human genetics, 1998. **63**(6): p. 1588.
266. Perl, A.K., et al., *A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma*. Nature, 1998. **392**(6672): p. 190-193.
267. Guilford, P., et al., *E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 402-405.
268. Suriano, G., et al., *The intracellular E-cadherin germline mutation V832 M lacks the ability to mediate cell-cell adhesion and to suppress invasion*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5716-5719.
269. Hirohashi, S., *Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers*. American Journal of Pathology, 1998. **153**(2): p. 333.
270. Mareel, M., M. Bracke, and F. Van Roy, *Invasion promoter versus invasion suppressor molecules: the paradigm of E-cadherin*. Mol Biol Rep, 1994. **19**(1): p. 45-67.
271. Mareel, M., et al., *Downregulation in vivo of the invasion-suppressor molecule E-cadherin in experimental and clinical cancer*. Princess Takamatsu Symp, 1994. **24**: p. 63-80.
272. Yang, J.Y., et al., *MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation*.

- Molecular and cellular biology, 2006. **26**(19): p. 7269.
273. Noe, V., et al., *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. Journal of cell science, 2001. **114**(1): p. 111.
  274. Davies, G., W.G. Jiang, and M.D. Mason, *Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells*. Clinical cancer research, 2001. **7**(10): p. 3289.
  275. Marambaud, P., et al., *A presenilin-1/-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions*. The EMBO Journal, 2002. **21**(8): p. 1948-1956.
  276. Kang, Y. and J. Massagué, *Epithelial-Mesenchymal Transitions:: Twist in Development and Metastasis*. Cell, 2004. **118**(3): p. 277-279.
  277. Perrais, M., et al., *E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions*. Science's STKE, 2007. **18**(6): p. 2013.
  278. Stockinger, A., et al., *E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent -catenin transcriptional activity*. The Journal of cell biology, 2001. **154**(6): p. 1185.
  279. Wong, A.S.T. and B.M. Gumbiner, *Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin*. The Journal of cell biology, 2003. **161**(6): p. 1191.
  280. Herzig, M., et al., *Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of -catenin/Tcf-mediated Wnt signaling*. Oncogene, 2006. **26**(16): p. 2290-2298.
  281. Zohn, I.E., et al., *p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation*. Cell, 2006. **125**(5): p. 957-969.
  282. Mueller, A.G., et al., *Embryonic lethality caused by apoptosis during gastrulation in mice lacking the gene of the ADP-ribosylation factor-related protein 1*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(5): p. 1488.
  283. Christensen, A.K. and A.M. Jensen, *Tissue-specific requirements for specific domains in the FERM protein Moe/Epb 4. 1 I 5 during early zebrafish development*. BMC Developmental Biology, 2008. **8**(1): p. 3.
  284. Hirano, M., et al., *EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of cell biology, 2008. **182**(6): p. 1217.
  285. Soler, A.P., et al., *P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival*. Cancer, 1999. **86**(7): p. 1263-1272.
  286. Kovacs, A., J. Dhillon, and R.A. Walker, *Expression of P-cadherin, but not E-cadherin or N-cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas*. Molecular Pathology, 2003. **56**(6): p. 318.
  287. Fanelli, M.A., et al., *P-Cadherin and -catenin are useful prognostic markers in breast cancer patients; -catenin interacts with heat shock protein Hsp27*. Cell Stress and Chaperones, 2008. **13**(2): p. 207-220.
  288. Bussemakers, M.J.G., et al., *Complex cadherin expression in human prostate cancer cells*. International Journal of Cancer, 2000. **85**(3): p. 446-450.
  289. Cavallaro, U., B. Schaffhauser, and G. Christofori, *Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch?* Cancer letters, 2002. **176**(2): p. 123-128.
  290. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(2): p. 118-132.
  291. Paul, R., et al., *The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression*. British journal of urology, 1997. **79**: p. 37.
  292. Hatta, K., et al., *Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos\* 1*. Developmental biology, 1987. **120**(1): p. 215-227.
  293. Inuzuka, H., C. Redies, and M. Takeichi, *Differential expression of R- and N-cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development*. Development, 1991. **113**(3): p. 959.
  294. Duband, J.L., et al., *Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development*. Cells Tissues Organs, 1995. **154**(1): p. 63-78.
  295. Nose, A. and M. Takeichi, *A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos*. Journal of Cell Biology, 1986. **103**(6): p. 2649.
  296. Radice, G.L., et al., *Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice*. The Journal of cell biology, 1997. **139**(4): p. 1025.
  297. Adams, C.L., W.J. Nelson, and S.J. Smith, *Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion*. Journal of Cell Biology, 1996. **135**(6): p. 1899.
  298. Angres, B., A. Barth, and W.J. Nelson, *Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay*. Journal of Cell Biology, 1996. **134**(2): p. 549.
  299. Siliciano, J.D. and D.A. Goodenough, *Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. Journal of Cell Biology, 1988. **107**(6): p. 2389.
  300. Gumbiner, B., B. Stevenson, and A. Grimaldi, *The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex*. Journal of Cell Biology, 1988. **107**(4): p. 1575.
  301. Pasdar, M. and W.J. Nelson, *Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. I. Biochemical analysis*. Journal of Cell Biology, 1988. **106**(3): p. 677.
  302. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. American Journal of Physiology- Cell Physiology, 2004. **286**(6): p. C1213.
  303. Ikenouchi, J., et al., *Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail*. Journal of cell science, 2003. **116**(10): p. 1959.
  304. Ohkubo, T. and M. Ozawa, *The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation*. Journal of cell science, 2004. **117**(9): p. 1675.
  305. Itoh, M. and M.J. Bissell, *The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis*. Journal of

- mammary gland biology and neoplasia, 2003. **8**(4): p. 449-462.
306. Tselepis, C., et al., *Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(14): p. 8064.
  307. Bosch, F.X., et al., *E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components*. International Journal of Cancer, 2005. **114**(5): p. 779-790.
  308. Thiery, J.P. and R. Huang, *Linking epithelial-mesenchymal transition to the well-known polarity protein Par6*. Dev Cell, 2005. **8**(4): p. 456-8.
  309. Wang, X., et al., *Downregulation of Par-3 expression and disruption of Par complex integrity by TGF-beta during the process of epithelial to mesenchymal transition in rat proximal epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(1): p. 51-9.
  310. Spaderna, S., et al., *The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(2): p. 537-44.
  311. Whiteman, E.L., et al., *The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apical-basal polarity complexes*. Oncogene, 2008. **27**(27): p. 3875-3879.
  312. Aigner, K., et al., *The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity*. Oncogene, 2007. **26**(49): p. 6979-88.
  313. Silvestri, M., et al., *Fluticasone and salmeterol downregulate in vitro, fibroblast proliferation and ICAM-1 or H-CAM expression*. European Respiratory Journal, 2001. **18**(1): p. 139.
  314. Conacci-Sorrell, M.E., et al., *Nr-CAM is a target gene of the -catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis*. Genes & development, 2002. **16**(16): p. 2058.
  315. Gavert, N., et al., *Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis*. Cancer research, 2007. **67**(16): p. 7703.
  316. Gavert, N., et al., *L1, a novel target of -catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers*. The Journal of cell biology, 2005. **168**(4): p. 633.
  317. Conacci-Sorrell, M., et al., *The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation*. Cancer research, 2005. **65**(24): p. 11605.
  318. Christofori, G., *New signals from the invasive front*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 444-450.
  319. Lehenbre, F., et al., *NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin*. The EMBO Journal, 2008. **27**(19): p. 2603-2615.
  320. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev, *Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors*. Trends in molecular medicine, 2008. **14**(5): p. 199-209.
  321. Newgreen, D.F. and J. Minichiello, *Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors*. Developmental biology, 1995. **170**(1): p. 91-101.
  322. Homan, S.M., et al., *Regulation of the Association of [alpha] 6 [beta] 4 with Vimentin Intermediate Filaments in Endothelial Cells*. Experimental cell research, 2002. **281**(1): p. 107-114.
  323. Helfand, B.T., L. Chang, and R.D. Goldman, *Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture*. Journal of cell science, 2004. **117**(2): p. 133.
  324. Correia, I., et al., *Integrating the Actin and Vimentin Cytoskeletons*. The Journal of cell biology, 1999. **146**(4): p. 831.
  325. Mücke, N., et al., *Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin*. Journal of molecular biology, 2004. **340**(1): p. 97-114.
  326. Herrmann, H., et al., *Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity*. 2009.
  327. Georgatos, S.D. and G. Blobel, *Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments*. Journal of Cell Biology, 1987. **105**(1): p. 105.
  328. Gonzales, M., et al., *Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells*. Molecular Biology of the Cell, 2001. **12**(1): p. 85.
  329. Kreis, S., et al., *The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin [alpha] 2[beta] 1 cytoplasmic tail complex and co-localizes with native [alpha] 2[beta] 1 in endothelial cell focal adhesions*. Experimental cell research, 2005. **305**(1): p. 110-121.
  330. Green, K.J. and R.D. Goldman, *Evidence for an interaction between the cell surface and intermediate filaments in cultured fibroblasts*. Cell motility and the cytoskeleton, 1986. **6**(4): p. 389-405.
  331. Hay, E.D. and A. Zuk, *Transformations between epithelium and mesenchyme: Normal, pathological, and experimentally induced\* 1*. American Journal of Kidney Diseases, 1995. **26**(4): p. 678-690.
  332. Badwaik, N.K., J.J. Rasweiler IV, and F. Muradali, *Co-expression of cytokeratins and vimentin by highly invasive trophoblast in the white-winged vampire bat, Diaemus youngi, and the black mastiff bat, Molossus ater, with observations on intermediate filament proteins in the decidua and intraplacental trophoblast*. Reproduction, 1998. **114**(2): p. 307.
  333. Gilles, C., et al., *Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration*. Journal of cell science, 1999. **112**(24): p. 4615.
  334. SundarRaj, N., et al., *Expression of vimentin by rabbit corneal epithelial cells during wound repair*. Cell and tissue research, 1992. **267**(2): p. 347-356.
  335. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
  336. Eckes, B., et al., *Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts*. Journal of cell science, 1998. **111**(13): p. 1897.
  337. Eckes, B., et al., *Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin*. Journal of cell science, 2000. **113**(13): p. 2455.
  338. Ramaekers, F.C., et al., *Coexpression of keratin- and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983. **80**(9): p. 2618.



339. Savagner, P., et al., *Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression*. Cancer Treat Res, 1994. **71**: p. 229-49.
340. Singh, S., et al., *Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer*. Cancer research, 2003. **63**(9): p. 2306.
341. Korsching, E., et al., *The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential?* The Journal of pathology, 2005. **206**(4): p. 451-457.
342. Wu, M., et al., *Proteome analysis of human androgen-independent prostate cancer cell lines: variable metastatic potentials correlated with vimentin expression*. Proteomics, 2007. **7**(12): p. 1973-1983.
343. Zhang, X., et al., *Inhibition of vimentin or 1 integrin reverts morphology of prostate tumor cells grown in laminin-rich extracellular matrix gels and reduces tumor growth in vivo*. Molecular cancer therapeutics, 2009. **8**(3): p. 499.
344. Wu, K., et al., *Silibinin inhibits prostate cancer invasion, motility and migration by suppressing vimentin and MMP-2 expression*. Acta Pharmacologica Sinica, 2009.
345. Leader, M., et al., *Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker*. Histopathology, 1987. **11**(1): p. 63-72.
346. Domagala, W., et al., *Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary, but not in lobular breast carcinomas*. The American Journal of Pathology, 1990. **137**(5): p. 1059.
347. Kokkinos, M.I., et al., *Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer—observations in vitro and in vivo*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 191-203.
348. Vora, H.H., et al., *Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer*. The International journal of biological markers, 2009. **24**(1): p. 38-46.
349. Keller, R., *Cell migration during gastrulation*. Current opinion in cell biology, 2005. **17**(5): p. 533-541.
350. Locascio, A. and M.A. Nieto, *Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration*. Current opinion in genetics & development, 2001. **11**(4): p. 464-469.
351. Ellenbroek, S.I.J. and J.G. Collard, *Rho GTPases: functions and association with cancer*. Clinical and Experimental Metastasis, 2007. **24**(8): p. 657-672.
352. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-374.
353. Gilles, C. and E.W. Thompson, *The epithelial to mesenchymal transition and metastatic progression in carcinoma*. The Breast Journal, 1996. **2**(1): p. 83-96.
354. Comoglio, P.M. and L. Trusolino, *Cancer: the matrix is now in control*. Nature medicine, 2005. **11**(11): p. 1156-1157.
355. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
356. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008. **9**(6): p. 446-454.
357. Kiuchi, T., et al., *Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers*. The Journal of cell biology, 2007. **177**(3): p. 465.
358. Giganti, A., et al., *Actin-filament cross-linking protein T-plastin increases Arp2/3-mediated actin-based movement*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(6): p. 1255.
359. Courson, D.S. and R.S. Rock, *Actin Cross-link Assembly and Disassembly Mechanics for -Actinin and Fascin*. Journal of Biological Chemistry. **285**(34): p. 26350.
360. Glenney Jr, J.R., et al., *F-actin binding and bundling properties of fimbrin, a major cytoskeletal protein of microvillus core filaments*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(17): p. 9283.
361. Butcher, D.T., T. Alliston, and V.M. Weaver, *A tense situation: forcing tumour progression*. Nat Rev Cancer. 2009 Feb;9(2):108-22.
362. Vicente-Manzanares, M., et al., *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(11): p. 778-790.
363. Larsen, M., M.L. Tremblay, and K.M. Yamada, *Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(9): p. 700-711.
364. Spudich, J.A., *The myosin swinging cross-bridge model*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(5): p. 387-392.
365. Hall, A. and C.D. Nobes, *Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2000. **355**(1399): p. 965.
366. Raftopoulou, M. and A. Hall, *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. Developmental biology, 2004. **265**(1): p. 23-32.
367. Deeks, M.J., et al., *Arabidopsis CAP1 a key regulator of actin organisation and development*. Journal of cell science, 2007. **120**(15): p. 2609.
368. Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small, *Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics*. Current Biology, 1999. **9**(12): p. 640-648.
369. Sander, E.E., et al., *Rac Downregulates Rho Activity*. The Journal of cell biology, 1999. **147**(5): p. 1009.
370. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704.
371. Wheeler, A.P. and A.J. Ridley, *Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility*. Experimental cell research, 2004. **301**(1): p. 43-49.
372. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiological reviews, 2003. **83**(4): p. 1325.
373. Bresnick, A.R., *Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation*. Current opinion in cell biology, 1999. **11**(1): p. 26-33.
374. Okada, H., et al., *Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation*. American Journal of Physiology- Renal Physiology, 1997. **273**(4): p. 563.
375. Garrett, S.C., et al., *S100A4, a mediator of metastasis*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(2): p. 677.

376. Loennechen, T., et al., *Colchicine induces membrane-associated activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells in an S100A4-independent manner*. Biochemical pharmacology, 2003. **66**(12): p. 2341-2353.
377. Kriaievska, M., et al., *Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(16): p. 9852.
378. Ballestrem, C., et al., *Marching at the front and dragging behind*. The Journal of cell biology, 2001. **155**(7): p. 1319.
379. Mellman, I., *Quo vadis: polarized membrane recycling in motility and phagocytosis*. The Journal of cell biology, 2000. **149**(3): p. 529.
380. Bretscher, M.S., *Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells*. Cell, 1996. **87**(4): p. 601-606.
381. Regen, C.M. and A.F. Horwitz, *Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts*. Journal of Cell Biology, 1992. **119**(5): p. 1347.
382. Smilenov, L.B., et al., *Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1172.
383. Taylor, D.L., et al., *The contractile basis of amoeboid movement: I. The chemical control of motility in isolated cytoplasm*. Journal of Cell Biology, 1973. **59**(2): p. 378.
384. Fukui, Y., *Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division*. International review of cytology, 1993: p. 85-85.
385. De Bruyn, P.P.H., *The amoeboid movement of the mammalian leukocyte in tissue culture*. The Anatomical Record, 1946. **95**(2): p. 177-191.
386. Wolf, K., et al., *Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases*. Blood, 2003. **102**(9): p. 3262.
387. Wolf, K., et al., *Compensation mechanism in tumor cell migration*. The Journal of cell biology, 2003. **160**(2): p. 267.
388. Rørth, P., *Collective guidance of collective cell migration*. Trends in cell biology, 2007. **17**(12): p. 575-579.
389. Ghabrial, A., et al., *Branching morphogenesis of the Drosophila tracheal system*. Annual review of cell and developmental biology, 2003. **19**(1): p. 623-647.
390. Zegers, M.M.P., et al., *Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro\* 1*. Trends in cell biology, 2003. **13**(4): p. 169-176.
391. Arnoux, V., et al., *Cutaneous wound reepithelialization: a partial and reversible EMT*. Rise and fall of epithelial phenotype: concepts of epithelial-mesenchymal transition, 2005: p. 111.
392. Omelchenko, T., et al., *Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(19): p. 10788.
393. Waldherr, R. and K. Schwechheimer, *Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate-sized filaments in renal cell carcinomas*. Virchows Archiv, 1985. **408**(1): p. 15-27.
394. Raymond, W.A. and A.S.Y. Leong, *Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in benign and neoplastic breast epithelium*. The Journal of pathology, 1989. **157**(4): p. 299-306.
395. Blick, T., et al., *Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines*. Clinical and Experimental Metastasis, 2008. **25**(6): p. 629-642.
396. Friedl, P. and K. Wolf, *Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion*. Cancer research, 2008. **68**(18): p. 7247.
397. Yang, J. and R.A. Weinberg, *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. Developmental cell, 2008. **14**(6): p. 818-829.
398. Moll, R., et al., *Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas*. The American Journal of Pathology, 1993. **143**(6): p. 1731.
399. Friedl, P., Y. Hegerfeldt, and M. Tusch, *Collective cell migration in morphogenesis and cancer*. International Journal of Developmental Biology, 2004. **48**: p. 441-450.
400. Wolf, K., et al., *Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(8): p. 893-904.
401. Przybylo, J.A. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition: tumor progression at Snail's pace*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(6): p. 1082-1088.
402. Schneider, S., et al., *Catenins in Xenopus embryogenesis and their relation to the cadherin-mediated cell-cell adhesion system*. Development, 1993. **118**(2): p. 629-40.
403. Kemler, R., *From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion*. Trends Genet, 1993. **9**(9): p. 317-21.
404. Eger, A., et al., *Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of -catenin and upregulation of -catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity*. The Journal of cell biology, 2000. **148**(1): p. 173.
405. Aberle, H., et al., *-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. The EMBO journal, 1997. **16**(13): p. 3797-3804.
406. Liu, C., et al., *Control of [beta]-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. **108**(6): p. 837-847.
407. Liu, C., et al., *-Trcp couples -catenin phosphorylation-degradation and regulates Xenopus axis formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(11): p. 6273.
408. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. 2004.
409. Mosimann, C., G. Hausmann, and K. Basler, *-catenin hits chromatin: Regulation of Wnt target gene activation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(4): p. 276-286.
410. Park, E.J., et al., *Novel small molecule activators of [beta]-catenin-mediated signaling pathway: structure-activity relationships of indirubins*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009. **19**(8): p. 2282-2284.
411. Seeling, J.M., et al., *Regulation of-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A*. Science, 1999. **283**(5410): p. 2089.

412. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev, *-Catenin signaling in biological control and cancer*. Journal of cellular biochemistry, 2007. **102**(4): p. 820-828.
413. Clevers, H. and M. Van de Wetering, *TCF/LEF factors earn their wings*. Trends in Genetics, 1997. **13**(12): p. 485-489.
414. Clevers, H., *Wnt/[beta]-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-480.
415. Zhang, F., R.L. White, and K.L. Neufeld, *Cell density and phosphorylation control the subcellular localization of adenomatous polyposis coli protein*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(23): p. 8143.
416. Ferrarese, A., et al., *Chemical Dissection of the APC Repeat 3 Multistep Phosphorylation by the Concerted Action of Protein Kinases CK1 and GSK3 $\beta$* . Biochemistry, 2007. **46**(42): p. 11902-11910.
417. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(10): p. 769-776.
418. Brembeck, F.H., M. Rosário, and W. Birchmeier, *Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of [beta]-catenin*. Current opinion in genetics & development, 2006. **16**(1): p. 51-59.
419. Steinberg, M.S. and P.M. McNutt, *Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions*. Current opinion in cell biology, 1999. **11**(5): p. 554-560.
420. Lilien, J. and J. Balsamo, *The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of -catenin*. Current opinion in cell biology, 2005. **17**(5): p. 459-465.
421. Comoglio, P.M., C. Boccaccio, and L. Trusolino, *Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules*. Current opinion in cell biology, 2003. **15**(5): p. 565-571.
422. Andl, C.D. and A.K. Rustgi, *No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(1): p. 28-31.
423. Piedra, J., et al., *p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate {beta}-Catenin Tyr-142 Phosphorylation and {beta}-Catenin-{alpha}-Catenin Interaction*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(7): p. 2287.
424. Roura, S., et al., *Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(51): p. 36734.
425. Lickert, H., et al., *Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(7): p. 5090.
426. Song, D.H., et al., *CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of -catenin potentiates Wnt signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(26): p. 24018.
427. Ji, H., et al., *EGF-Induced ERK Activation Promotes CK2-Mediated Disassociation of [alpha]-Catenin from [beta]-Catenin and Transactivation of [beta]-Catenin*. Molecular cell, 2009. **36**(4): p. 547-559.
428. Eastman, Q. and R. Grosschedl, *Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals*. Current opinion in cell biology, 1999. **11**(2): p. 233-240.
429. Nelson, W.J. and R. Nusse, *Convergence of Wnt/{beta}-catenin, and cadherin pathways*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1483.
430. Lu, Z. and T. Hunter, *Wnt-independent beta-catenin transactivation in tumor development*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2004. **3**(5): p. 571.
431. Kennell, J.A., et al., *The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(40): p. 15417.
432. Iliopoulos, D., et al., *MicroRNA signature of primary pigmented nodular adrenocortical disease: clinical correlations and regulation of Wnt signaling*. Cancer research, 2009. **69**(8): p. 3278.
433. Arnold, S.J. and E.J. Robertson, *Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(2): p. 91-103.
434. He, X., et al., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/{beta}-catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. **131**(8): p. 1663.
435. Li, Y. and G. Bu, *LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis*. Future Oncology, 2005. **1**(5): p. 673-681.
436. Wodarz, A. and R. Nusse, *Mechanisms of Wnt signaling in development*. Annual review of cell and developmental biology, 1998. **14**(1): p. 59-88.
437. Briskin, C., et al., *Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling*. Genes & development, 2000. **14**(6): p. 650.
438. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Wnt genes*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1073-1087.
439. Wong, S.C.C., et al., *Expression of frizzled-related protein and Wnt-signalling molecules in invasive human breast tumours*. The Journal of pathology, 2002. **196**(2): p. 145-153.
440. Li, Y., et al., *Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(26): p. 15853.
441. Wong, G.T., B.J. Gavin, and A.P. McMahon, *Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes*. Molecular and cellular biology, 1994. **14**(9): p. 6278.
442. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. Genes & development, 2000. **14**(15): p. 1837.
443. Davidson, G., et al., *Casein kinase 1 couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 867-872.
444. Zeng, X., et al., *A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 873-877.
445. Willert, K. and K.A. Jones, *Wnt signaling: is the party in the nucleus?* Genes & development, 2006. **20**(11): p. 1394.
446. Tian, Y.C. and A.O. Phillips, *Interaction between the transforming growth factor-{beta} type II receptor/Smad pathway and {beta}-catenin during transforming growth factor-{beta} 1-mediated adherens junction disassembly*. American Journal of Pathology, 2002. **160**(5): p. 1619.
447. Stemmer, V., et al., *Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with -catenin*. Oncogene, 2008. **27**(37): p. 5075-5080.
448. Hecht, A. and R. Kemler, *Curbing the nuclear activities of -catenin*. EMBO reports, 2000. **1**(1): p. 24-28.

449. Crawford, H.C., et al., *The metalloproteinase matrilysin is a target of -catenin transactivation in intestinal tumors*. *Oncogene*, 1999. **18**(18): p. 2883-2891.
450. Gilles, C., et al., *Transactivation of Vimentin by {beta}-Catenin in Human Breast Cancer Cells*. *Cancer research*, 2003. **63**(10): p. 2658.
451. Hlubek, F., et al., *-Catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas*. *International Journal of Cancer*, 2004. **108**(2): p. 321-326.
452. Woodward, W.A., et al., *On mammary stem cells*. *Journal of cell science*, 2005. **118**(16): p. 3585.
453. Fodde, R. and T. Brabletz, *Wnt/[beta]-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior*. *Current opinion in cell biology*, 2007. **19**(2): p. 150-158.
454. Hajra, K.M. and E.R. Fearon, *Cadherin and catenin alterations in human cancer*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2002. **34**(3): p. 255-268.
455. Kuphal, F. and J. Behrens, *E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts*. *Experimental cell research*, 2006. **312**(4): p. 457-467.
456. Kim, K., Z. Lu, and E.D. Hay, *Direct evidence for a role of [beta]-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT*. *Cell biology international*, 2002. **26**(5): p. 463-476.
457. Yook, J.I., et al., *A Wnt-Axin2-GSK3 cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells*. *Nature Cell Biology*, 2006. **8**(12): p. 1398-1406.
458. de Leeuw, W.J.F., et al., *Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ*. *The Journal of pathology*, 1997. **183**(4): p. 404-411.
459. Pedersen, K.B., et al., *Expression of S100A4, E-cadherin, -and -catenin in breast cancer biopsies*. *British journal of cancer*, 2002. **87**(11): p. 1281-1286.
460. Bukholm, I.K., et al., *E-cadherin and -, -, and -catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma*. *The Journal of pathology*, 1998. **185**(3): p. 262-266.
461. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(18): p. 10393.
462. Lin, S.Y., et al., *-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(8): p. 4262.
463. Huang, D. and X. Du, *Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination*. 2008.
464. Polakis, P., *The many ways of Wnt in cancer*. *Current opinion in genetics & development*, 2007. **17**(1): p. 45-51.
465. Nagahata, T., et al., *Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the Drosophila disheveled gene, in primary breast cancers*. *Cancer science*, 2003. **94**(6): p. 515-518.
466. Gray, A.M. and A.J. Mason, *Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly*. *Science*, 1990. **247**(4948): p. 1328.
467. Derynck, R., Y. Zhang, and X.H. Feng, *Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses*. *Cell*, 1998. **95**(6): p. 737-40.
468. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGF {beta} activation*. *Journal of cell science*, 2003. **116**(2): p. 217.
469. Massagué, J., *How cells read TGF- signals*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000. **1**(3): p. 169-178.
470. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. Ten Dijke, *TGF-signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. *Nature*, 1997. **390**(6659): p. 465-471.
471. Coffey Jr, R.J., et al., *Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. Uptake, metabolism, and biliary excretion*. *Journal of Clinical Investigation*, 1987. **80**(3): p. 750.
472. Massague, J., *TGF- signal transduction*. *Annual review of biochemistry*, 1998. **67**(1): p. 753-791.
473. Massague, J., *The transforming growth factors*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1985. **10**(6): p. 237-240.
474. Cheifetz, S., et al., *The transforming growth factor-[beta] system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors*. *Cell*, 1987. **48**(3): p. 409-415.
475. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF- -induced epithelial to mesenchymal transition*. *Cell Research*, 2009. **19**(2): p. 156-172.
476. Zavadil, J. and E.P. Böttinger, *TGF- and epithelial-to-mesenchymal transitions*. *Oncogene*, 2005. **24**(37): p. 5764-5774.
477. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- family signalling*. *Nature*, 2003. **425**(6958): p. 577-584.
478. Zeisberg, M. and R. Kalluri, *The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis*. *Journal of Molecular Medicine*, 2004. **82**(3): p. 175-181.
479. Buijs, J.T., et al., *TGF- and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis*. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2007. **24**(8): p. 609-617.
480. Chaffer, C.L., E.W. Thompson, and E.D. Williams, *Mesenchymal to epithelial transition in development and disease*. *Cells Tissues Organs*, 2007. **185**(1-3): p. 7-19.
481. Di Marco, E., et al., *Autocrine interaction between TGF alpha and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype*. *Oncogene*, 1989. **4**(7): p. 831.
482. Strutz, F., et al., *Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation*. *Kidney international*, 2002. **61**(5): p. 1714-1728.
483. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
484. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. *Physiological reviews*, 2001. **81**(2): p. 807.
485. Citri, A. and Y. Yarden, *EGF-ERBB signalling: towards the systems level*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006. **7**(7): p. 505-516.
486. Cowan, K.J. and K.B. Storey, *Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress*. *Journal of Experimental Biology*, 2003. **206**(7): p. 1107.

487. Coulombe, P. and S. Meloche, *Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1376-1387.
488. Payne, D.M., et al., *Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)*. The EMBO Journal, 1991. **10**(4): p. 885.
489. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiological reviews, 1999. **79**(1): p. 143.
490. Jones, R.A. and R.A. Moorehead, *The Impact of Transgenic IGF-IR Overexpression on Mammary Development and Tumorigenesis*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2008. **13**(4): p. 407-413.
491. Acloque, H., J.P. Thiery, and M.A. Nieto, *The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the Epithelial-Mesenchymal Transition*. EMBO reports, 2008. **9**(4): p. 322-326.
492. Vara, J., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer treatment reviews, 2004. **30**(2): p. 193-204.
493. Hutchinson, J., et al., *Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(6): p. 2203.
494. Luo, J., B.D. Manning, and L.C. Cantley, *Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise*. Cancer cell, 2003. **4**(4): p. 257.
495. Julien, S., et al., *Activation of NF- B by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition*. Oncogene, 2007. **26**(53): p. 7445-7456.
496. Carnero, A., et al., *The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications*. Current Cancer Drug Targets, 2008. **8**(3): p. 187-198.
497. Chen, Z., et al., *Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway*. Genes & development, 1995. **9**(13): p. 1586.
498. Adhikari, A., M. Xu, and Z.J. Chen, *Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3214-3226.
499. Traenckner, E.B., et al., *Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli*. The EMBO Journal, 1995. **14**(12): p. 2876.
500. Winston, J.T., et al., *The SCF -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I B and -catenin and stimulates I B ubiquitination in vitro*. Genes & development, 1999. **13**(3): p. 270.
501. Fuchs, S.Y., V.S. Spiegelman, and K.G.S. Kumar, *The many faces of -TrCP E3 ubiquitin ligases: Reflections in the magic mirror of cancer*. Oncogene, 2004. **23**(11): p. 2028-2036.
502. Aggarwal, B.B., *Nuclear factor-[kappa] B: The enemy within*. Cancer cell, 2004. **6**(3): p. 203-208.
503. Nakshatri, H., et al., *Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth*. Molecular and cellular biology, 1997. **17**(7): p. 3629.
504. Sreseli, R., et al., *NF-kB Complex Activation and Association of {alpha} B-Crystallin and Vimentin with Poor Prognosis in Primary Breast Cancer*. Cancer research, 2009. **69**(24 Supplement): p. 2143.
505. Neil, J.R. and W.P. Schiemann, *Altered TAB1: IKK Interaction Promotes TGF- Mediated NF- B Activation During Breast Cancer Progression*. Cancer research, 2008. **68**(5): p. 1462.
506. Wang, X., et al., *Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(4): p. 470-478.
507. Huber, M.A., et al., *NF- B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(4): p. 569-581.
508. Romieu-Mourez, R.A. and M.A. Boston Univ Medical Campus, *Roles of Ikb-a Protein Kinases in Activation of NF-kB in Breast Cancer*. 2003.
509. Kim, L. and A.R. Kimmel, *GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis*. Current opinion in genetics & development, 2000. **10**(5): p. 508-514.
510. Bachelder, R.E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription*. The Journal of cell biology, 2005. **168**(1): p. 29.
511. Zhou, B.P., et al., *Dual regulation of Snail by GSK-3 mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition*. Nature Cell Biology, 2004. **6**(10): p. 931-940.
512. Frame, S., P. Cohen, and R.M. Biondi, *A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation*. Molecular cell, 2001. **7**(6): p. 1321-1327.
513. Doble, B.W. and J.R. Woodgett, *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. Journal of cell science, 2003. **116**(7): p. 1175.
514. Thomas, G.M., et al., *A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of Axin and [beta]-catenin*. FEBS letters, 1999. **458**(2): p. 247-251.
515. Webster, M.T., et al., *Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2000. **28**(4): p. 443-453.
516. Martinez, A., et al., *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation*. Medicinal research reviews, 2002. **22**(4): p. 373-384.
517. Ougolkov, A.V. and D.D. Billadeau, *Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy?* Future Oncology, 2006. **2**(1): p. 91-100.
518. Grimes, C.A. and R.S. Jope, *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 [beta] in cellular signaling*. Progress in Neurobiology, 2001. **65**(4): p. 391-426.
519. Eldar-Finkelman, H., *Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target*. Trends in molecular medicine, 2002. **8**(3): p. 126-132.
520. Lindsell, C.E., et al., *Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1*. Cell, 1995. **80**(6): p. 909-917.
521. LaVoie, M.J. and D.J. Selkoe, *The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by -secretase and presenilin/ -secretase and release signaling fragments*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(36): p. 34427.

522. Dontu, G., et al., *Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. R605-R615.
523. Farnie, G. and R.B. Clarke, *Mammary stem cells and breast cancer—role of Notch signalling*. Stem Cell Reviews and Reports, 2007. **3**(2): p. 169-175.
524. Wang, Z., et al., *The Role of Notch Signaling Pathway in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) During Development and Tumor Aggressiveness*. Current Drug Targets. **11**(6): p. 745-751.
525. Zavadil, J., et al., *Integration of TGF- $\beta$ /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition*. The EMBO Journal, 2004. **23**(5): p. 1155-1165.
526. Ozdamar, B., et al., *Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF $\beta$  Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity*. Science, 2005. **307**: p. 1603-1609.
527. Vilorio-Petit, A.M., et al., *A role for the TGF- $\beta$ -Par6 polarity pathway in breast cancer progression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(33): p. 14028.
528. Vardouli, L., A. Moustakas, and C. Stournaras, *LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(12): p. 11448.
529. Lamouille, S. and R. Derynck, *Cell size and invasion in TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway*. The Journal of cell biology, 2007. **178**(3): p. 437.
530. Allington, T.M., A.J. Galliher-Beckley, and W.P. Schiemann, *Activated Abl kinase inhibits oncogenic transforming growth factor- $\beta$  signaling and tumorigenesis in mammary tumors*. The FASEB Journal, 2009. **23**(12): p. 4231.
531. Jechlinger, M., et al., *Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(6): p. 1561-1570.
532. Dhasarathy, A., M. Kajita, and P.A. Wade, *The Transcription Factor Snail Mediates Epithelial to Mesenchymal Transitions by Repression of Estrogen Receptor- $\alpha$* . Molecular Endocrinology, 2007. **21**(12): p. 2907.
533. Zuo, L., W. Li, and S. You, *Progesterone reverses the mesenchymal phenotypes of basal phenotype breast cancer cells via a membrane progesterone receptor mediated pathway*. Breast Cancer Research. **12**(3): p. R34.
534. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
535. Nieto, M., *Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives*. Int J Dev Biol, 2008. **52**.
536. De Herreros, A.G., et al., *Snail Family Regulation and Epithelial Mesenchymal Transitions in Breast Cancer Progression*. Journal of mammary gland biology and neoplasia: p. 1-13.
537. Bolos, V., et al., *The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors*. Journal of cell science, 2003. **116**(3): p. 499.
538. Peinado, H., et al., *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(1): p. 306.
539. Vetter, G., et al., *Time-resolved analysis of transcriptional events during SNAI1-triggered epithelial to mesenchymal transition*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **385**(4): p. 485-491.
540. Vincent, A. and I. Van Seuning, *Epigenetics, stem cells and epithelial cell fate*. Differentiation, 2009. **78**(2-3): p. 99-107.
541. Teng, Y., M. Zeisberg, and R. Kalluri, *Transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(2): p. 304-306.
542. Thuault, S., et al., *Transforming growth factor- $\beta$  employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of cell biology, 2006. **174**(2): p. 175.
543. Okada, H., et al., *Identification of a novel cis-acting element for fibroblast-specific transcription of the FSP1 gene*. American Journal of Physiology- Renal Physiology, 1998. **275**(2): p. 306.
544. Grimm, S.L. and J.M. Rosen, *The role of C/EBP in mammary gland development and breast cancer*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2003. **8**(2): p. 191-204.
545. Xue, C., et al., *The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis*. Cancer research, 2003. **63**(12): p. 3386.
546. Faniello, M.C., et al., *p53-Mediated downregulation of H ferritin promoter transcriptional efficiency via NF-Y*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2008. **40**(10): p. 2110-2119.
547. Massari, M.E. and C. Murre, *Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms*. Molecular and cellular biology, 2000. **20**(2): p. 429.
548. Moreno-Bueno, G., et al., *Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition*. Cancer research, 2006. **66**(19): p. 9543.
549. Sobrado, V.R., et al., *The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT*. Journal of cell science, 2009. **122**(7): p. 1014.
550. Pérez-Moreno, M.A., et al., *A New Role for E12/E47 in the Repression of E-cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transitions*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(29): p. 27424.
551. Kowanetz, M., et al., *Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor  $\beta$  and bone morphogenetic protein*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(10): p. 4241.
552. Thisse, B., M.E. Messal, and F. Perrin-Schmitt, *The twist gene: isolation of a Drosophila zygote gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern*. Nucleic Acids Research, 1987. **15**(8): p. 3439.
553. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. **117**(7): p. 927-939.
554. Puisieux, A., S. Valsesia-Wittmann, and S. Ansieau, *A twist for survival and cancer progression*. British journal of cancer, 2005. **94**(1): p. 13-17.
555. Ansieau, S., et al., *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting*

- inactivation of premature senescence. *Cancer cell*, 2008. **14**(1): p. 79-89.
556. Weinberg, R.A., *Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence*. *Nature Cell Biology*, 2008. **10**(9): p. 1021-1023.
  557. Ansieau, S., et al., *TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein*. *Oncogene*. **29**(22): p. 3173-3184.
  558. Chen, Z.F. and R.R. Behringer, *twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis*. *Genes & development*, 1995. **9**(6): p. 686.
  559. Martin, T.A., et al., *Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer*. *Annals of surgical oncology*, 2005. **12**(6): p. 488-496.
  560. Lee, T.K., et al., *Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition*. *Clinical cancer research*, 2006. **12**(18): p. 5369.
  561. Kwok, W.K., et al., *Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target*. *Cancer research*, 2005. **65**(12): p. 5153.
  562. Kajiyama, H., et al., *Twist expression predicts poor clinical outcome of patients with clear cell carcinoma of the ovary*. *Oncology*, 2007. **71**(5-6): p. 394-401.
  563. Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. *Cancer research*, 1992. **52**(6): p. 1399.
  564. Zhuo, W.L., et al., *Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008. **369**(4): p. 1098-1102.
  565. Bastid, J., A. Puisieux, and S. Ansieau, *Should We Consider Cancers as Embryonic Diseases or as Consequences of Stem-Cell Deregulation?* *Clinical Medicine: Oncology*, 2008. **2**: p. 363-366.
  566. Funahashi, J., et al., *Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis*. *Development*, 1993. **119**(2): p. 433-46.
  567. Postigo, A.A. and D.C. Dean, *ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(12): p. 6683.
  568. Vandewalle, C., et al., *SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions*. *Nucleic Acids Research*, 2005. **33**(20): p. 6566.
  569. Vandewalle, C., F. Van Roy, and G. Berx, *The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009. **66**(5): p. 773-787.
  570. Browne, G., A.E. Sayan, and E. Tulchinsky, *ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. **9**(5).
  571. Remacle, J.E., et al., *New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: EF1 family members bind with two hands to two target sites*. *The EMBO Journal*, 1999. **18**(18): p. 5073-5084.
  572. Verschueren, K., et al., *SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(29): p. 20489.
  573. Comijn, J., et al., *The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion*. *Molecular cell*, 2001. **7**(6): p. 1267-1278.
  574. Postigo, A.A., et al., *Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins*. *The EMBO Journal*, 2003. **22**(10): p. 2453.
  575. Nishimura, G., et al., *[delta] EF1 Mediates TGF-[beta] Signaling in Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation*. *Developmental cell*, 2006. **11**(1): p. 93-104.
  576. Peña, C., et al., *The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas*. *International Journal of Cancer*, 2006. **119**(9): p. 2098-2104.
  577. Sefton, M., S. Sanchez, and M.A. Nieto, *Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo*. *Development*, 1998. **125**(16): p. 3111.
  578. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002. **3**(3): p. 155-166.
  579. Kataoka, H., et al., *A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs*. *Nucleic Acids Research*, 2000. **28**(2): p. 626.
  580. Côme, C., et al., *Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression*. *Clinical cancer research*, 2006. **12**(18): p. 5395.
  581. Savagner, P., K.M. Yamada, and J.P. Thiery, *The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition*. *The Journal of cell biology*, 1997. **137**(6): p. 1403.
  582. Seki, K., et al., *Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(43): p. 41862.
  583. Manzanares, M., A. Locascio, and M.A. Nieto, *The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution*. *Trends in Genetics*, 2001. **17**(4): p. 178-181.
  584. Chiang, C.C.Y., *Characterization of SNAG-zinc finger protein (ZFP) transcription factors*. 2009, FLORIDA ATLANTIC UNIVERSITY.
  585. Hemavathy, K., S.I. Ashraf, and Y.T. Ip, *Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer*. *Gene*, 2000. **257**(1): p. 1-12.
  586. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. *Development*, 2005. **132**(14): p. 3151.
  587. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. *Nature Cell Biology*, 2000. **2**(2): p. 76-83.
  588. Lindley, L.E. and K.J. Briegel, *Molecular Characterization of TGF [beta]-Induced Epithelial Mesenchymal Transition in Normal Finite Lifespan Human Mammary Epithelial Cells*. *Biochemical and biophysical research communications*.



589. Vincent, T., et al., *A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-mediated epithelial-mesenchymal transition*. Nature Cell Biology, 2009.
590. Langer, E.M., et al., *Ajuba LIM proteins are snail/slugg corepressors required for neural crest development in Xenopus*. Developmental cell, 2008. **14**(3): p. 424-436.
591. Hou, Z., et al., *The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(10): p. 3198.
592. Lin, Y., et al., *The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1*. The EMBO Journal. **29**(11): p. 1803-1816.
593. Guaita, S., et al., *Snail Induction of Epithelial to Mesenchymal Transition in Tumor Cells Is Accompanied by MUC1 Repression and ZEB1 Expression*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(42): p. 39209.
594. Solanas, G., et al., *E-cadherin controls {beta}-catenin and NF- $\kappa$ B transcriptional activity in mesenchymal gene expression*. Journal of cell science, 2008. **121**(13): p. 2224.
595. Chua, H.L., et al., *NF- $\kappa$ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2*. Oncogene, 2006. **26**(5): p. 711-724.
596. Pálmer, H.G., et al., *Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of -catenin signaling*. The Journal of cell biology, 2001. **154**(2): p. 369.
597. Pálmer, H.G., et al., *The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer*. Nature medicine, 2004. **10**(9): p. 917-919.
598. Pena, C., et al., *E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations*. Human molecular genetics, 2005. **14**(22): p. 3361.
599. Jamora, C., et al., *A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis*. PLoS Biol, 2005. **3**(1): p. e11.
600. Paznekas, W.A., et al., *Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAIL1) and a related processed pseudogene (SNAIL1P)*. Genomics, 1999. **62**(1): p. 42-49.
601. Carver, E.A., et al., *The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(23): p. 8184.
602. Locascio, A., et al., *Modularity and reshuffling of Snail and Slug expression during vertebrate evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(26): p. 16841.
603. Vega, S., et al., *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes & development, 2004. **18**(10): p. 1131.
604. Kajita, M., K.N. McClinic, and P.A. Wade, *Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(17): p. 7559.
605. Escriba, M., et al., *Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(5): p. 1528.
606. Franci, C., et al., *Expression of Snail protein in tumor-stroma interface*. Oncogene, 2006. **25**(37): p. 5134-5144.
607. Elloul, S., et al., *Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(8): p. 1631-1643.
608. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. Cancer cell, 2005. **8**(3): p. 197-209.
609. Blanco, M.J., et al., *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas*. Oncogene, 2002. **21**(20): p. 3241-6.
610. Come, C., et al., *Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5395-402.
611. Kudo-Saito, C., et al., *Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells*. Cancer cell, 2009. **15**(3): p. 195-206.
612. Peinado, H., et al., *Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2827-39.
613. Boutet, A., et al., *Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney*. The EMBO Journal, 2006. **25**(23): p. 5603-5613.
614. Boutet, A., et al., *Reactivation of Snail Genes in Renal Fibrosis and Carcinomas*. Cell Cycle, 2007. **6**(6): p. 638-642.
615. De Craene, B., F. Van Roy, and G. Berx, *Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors*. Cellular signalling, 2005. **17**(5): p. 535-547.
616. Robert, G., et al., *SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development*. Cancer research, 2006. **66**(15): p. 7516.
617. Grottegut, S., et al., *Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail*. The EMBO Journal, 2006. **25**(15): p. 3534-3545.
618. Thuault, S. and E. Tan, *HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(48): p. 33437.
619. Hu, C.T., et al., *Snail associates with EGR-1 and SP-1 to upregulate transcriptional activation of p15/INK4b*. Febs Journal. **277**(5): p. 1202-1218.
620. Benbow, U. and C.E. Brinckerhoff, *The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?* Matrix Biology, 1997. **15**(8-9): p. 519-526.
621. Vergeer, W.P., et al., *Interaction of Ap1, Ap2, and Sp1 with the Regulatory Regions of the Human Pro- $\alpha$ 1(I) Collagen Gene*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **377**(1): p. 69-79.
622. Vallin, J., et al., *Cloning and Characterization of Three Xenopus Slug Promoters Reveal Direct Regulation by Lef/-Catenin Signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(32): p. 30350.
623. Sakai, D., et al., *Regulation of Slug transcription in embryonic ectoderm by -catenin-Lef/Tcf and BMP-Smad signaling*. Development, Growth & Differentiation, 2005. **47**(7): p. 471-482.

624. Giese, K., A. Amsterdam, and R. Grosschedl, *DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1*. *Genes & development*, 1991. **5**(12b): p. 2567.
625. Conacci-Sorrell, M., et al., *Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions*. *The Journal of cell biology*, 2003. **163**(4): p. 847.
626. Stemmer, V., et al., *Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin*. *Oncogene*, 2008. **27**(37): p. 5075.
627. Barberà, M.J., et al., *Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(44): p. 7345-7354.
628. Carter, C.L., et al., *Phosphorylated p68 RNA helicase activates snail1 transcription by promoting HDAC1 dissociation from the snail1 promoter*. *Oncogene*.
629. Yang, L., C. Lin, and Z.R. Liu, *P68 RNA Helicase Mediates PDGF-Induced Epithelial Mesenchymal Transition by Displacing Axin from [beta]-Catenin*. *Cell*, 2006. **127**(1): p. 139-155.
630. Ip, Y.T., et al., *dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo*. *Genes & development*, 1992. **6**(8): p. 1518.
631. Palmer, M.B., et al., *A 3'enhancer controls snail expression in melanoma cells*. *Cancer research*, 2007. **67**(13): p. 6113.
632. Palmer, M.B., et al., *Yin Yang 1 regulates the expression of Snail through a distal enhancer*. *Molecular Cancer Research*, 2009. **7**(2): p. 221.
633. Fujita, N., et al., *MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer*. *Cell*, 2003. **113**(2): p. 207-219.
634. Kumar, R., *Another tie that binds the MTA family to breast cancer*. *Cell*, 2003. **113**(2): p. 142-143.
635. Spoelstra, N.S., et al., *The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers*. *Cancer research*, 2006. **66**(7): p. 3893.
636. Dillner, N.B. and M.M. Sanders, *Transcriptional activation by the zinc-finger homeodomain protein EF1 in estrogen signaling cascades*. *DNA and cell biology*, 2004. **23**(1): p. 25-34.
637. Chen, Y.J., et al., *Oestrogen-induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis*. *The Journal of pathology*.
638. Gallo, D., C. Ferlini, and G. Scambia, *The Epithelial-Mesenchymal Transition and the Estrogen-Signaling in Ovarian Cancer*. *Current Drug Targets*. **11**(4): p. 474-481.
639. Peiró, S., et al., *Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression*. *Nucleic Acids Research*, 2006. **34**(7): p. 2077.
640. Freeman, M., *Feedback control of intercellular signalling in development*. *Nature*, 2000. **408**(6810): p. 313-319.
641. Sakai, D., et al., *Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development*. *Development*, 2006. **133**(7): p. 1323.
642. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
643. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 86-89.
644. Mello, C.C. and D. Conte, *Revealing the world of RNA interference*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 338-342.
645. Du, Y., et al., *Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth*. *Journal of Gastroenterology*, 2009. **44**(6): p. 556-561.
646. Peter, M.E., *Regulating cancer stem cells the miR way*. *Cell Stem Cell*. **6**(1): p. 4-6.
647. Valastyan, S., et al., *A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis*. *Cell*, 2009. **137**(6): p. 1032-1046.
648. Lecellier, C.H., et al., *A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells*. *Science*, 2005. **308**(5721): p. 557.
649. Cano, A. and M.A. Nieto, *Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition*. *Trends in cell biology*, 2008. **18**(8): p. 357-359.
650. Zavadil, J., et al., *Transforming growth factor- and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity*. *Cells Tissues Organs*, 2007. **185**(1-3): p. 157-161.
651. Hurteau, G.J., et al., *Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(13): p. 2064-2069.
652. Gregory, P.A., et al., *MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2008. **7**(20): p. 3112.
653. Saydam, O., et al., *Downregulated MicroRNA-200a in Meningiomas Promotes Tumor Growth by Reducing E-Cadherin and Activating the Wnt[beta]-Catenin Signaling Pathway*. *Molecular and cellular biology*, 2009. **29**(21): p. 5923.
654. Nagel, R., et al., *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. *Cancer research*, 2008. **68**(14): p. 5795.
655. Kim, H.H., et al. *PTEN tumor suppressor gene specific bioluminescent imaging system modulated by microRNA21*. 2009: Soc Nuclear Med.
656. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(2): p. 647.
657. Kapinas, K., et al., *miR-29 modulates WNT signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop*. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(33): p. 25221.
658. Korpai, M., et al., *The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(22): p. 14910.
659. Burk, U., et al., *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells*. *EMBO reports*, 2008. **9**(6): p. 582.
660. Wang, S.P., et al., *p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug*. *Nature Cell Biology*, 2009. **11**(6): p. 694-704.
661. Kim, D., J. Song, and E.J. Jin, *MicroRNA-221 regulates chondrogenic differentiation through promoting proteasomal degradation of slug by targeting mdm2*. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(35): p. 26900.
662. Vetter, G., et al., *miR-661 expression in SNAI1-induced epithelial to mesenchymal transition*

- contributes to breast cancer cell invasion by targeting Nectin-1 and StarD10 messengers. *Oncogene*, 2003. **29**(31): p. 4436-4448.
663. Dominguez, D., et al., *Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor*. *Molecular and cellular biology*, 2003. **23**(14): p. 5078.
  664. Schlessinger, K. and A. Hall, *GSK-3 sets Snail's pace*. *Nature Cell Biology*, 2004. **6**(10): p. 913-915.
  665. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Switching on-off snail: LOXL2 versus GSK3*. *Cell Cycle*, 2005. **4**(12): p. 1749-1752.
  666. Yook, J.I., et al., *Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(12): p. 11740.
  667. Xu, Y., et al., *Role of CK1 in GSK3 -mediated phosphorylation and degradation of Snail*. *Oncogene*.
  668. MacPherson, M.R., et al., *Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A*. *Mol Biol Cell*. 2010 Jan;21(2):244-53. Epub 2009 Nov 18.
  669. Wu, Y., B.M. Evers, and B.P. Zhou, *Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(1): p. 640.
  670. Yang, C.C. and D.A. Wolf, *Inflamed Snail Speeds Metastasis*. *Cancer cell*, 2009. **15**(5): p. 355-357.
  671. Yamashita, S., et al., *Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer*. *Nature*, 2004. **429**(6989): p. 298-302.
  672. Taylor, K.M., S. Hiscox, and R.I. Nicholson, *Zinc transporter LIV-1: a link between cellular development and cancer progression*. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2004. **15**(10): p. 461-463.
  673. Viñas-Castells, R., et al., *The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets Snail1 for proteasome degradation*. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(6): p. 3794.
  674. Schweitzer, K., et al., *CSN controls NF-kappaB by deubiquitinylation of IkappaBalpha*. *The EMBO Journal*, 2007. **26**(6): p. 1532.
  675. Wu, Y., et al., *Stabilization of Snail by NF-[kappa] B Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion*. *Cancer cell*, 2009. **15**(5): p. 416-428.
  676. Peinado, H., *A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression*. *The EMBO Journal*, 2005. **24**(19): p. 3446-3458.
  677. Kumar, R., A.E. Gururaj, and C.J. Barnes, *p21-activated kinases in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2006. **6**(6): p. 459-471.
  678. Yang, Z., et al., *Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions*. *Cancer research*, 2005. **65**(8): p. 3179.
  679. Deguchi, A., et al., *LKB1 Suppresses p21-activated Kinase-1 (PAK1) by Phosphorylation of Thr109 in the p21-binding Domain*. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(24): p. 18283.
  680. Aylon, Y., et al., *A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization*. *Genes & development*, 2006. **20**(19): p. 2687.
  681. Abe, Y., et al., *LATS2-Ajuba complex regulates [gamma]-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis*. *FEBS letters*, 2006. **580**(3): p. 782-788.
  682. Das Thakur, M., et al., *Ajuba LIM Proteins Are Negative Regulators of the Hippo Signaling Pathway*. *Current Biology*.
  683. Hunter, T., et al., *Receptor protein tyrosine kinases and phosphatases*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1992. **57**: p. 25-41.
  684. Hunter, T. and M. Karin, *The regulation of transcription by phosphorylation*. *Cell*, 1992. **70**(3): p. 375-87.
  685. Cohen, P., *Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?* *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002. **1**(4): p. 309-315.
  686. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. *Science*, 2002. **298**(5600): p. 1912.
  687. Burnett, G. and E.P. Kennedy, *The enzymatic phosphorylation of proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 1954. **211**(2): p. 969.
  688. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 225.
  689. Alonso, A., et al., *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. *Cell*, 2004. **117**(6): p. 699-711.
  690. Knighton, D.R., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase*. *Science*, 1991. **253**(5018): p. 407.
  691. Taylor, S.S., E. Radzio-Andzelm, and T. Hunter, *How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase*. *The FASEB Journal*, 1995. **9**(13): p. 1255.
  692. Liao, J.J.L., *Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors*. *J. Med. Chem*, 2007. **50**(3): p. 409-424.
  693. Fedorov, O., S. Müller, and S. Knapp, *The (un) targeted cancer kinome*. *Nature chemical biology*. **6**(3): p. 166-169.
  694. Meggio, F. and L.A. Pinna, *One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? The FASEB Journal*, 2003. **17**(3): p. 349.
  695. Gyenis, L. and D.W. Litchfield, *The emerging CK2 interactome: insights into the regulation and functions of CK2*. *Molecular and cellular biochemistry*, 2008. **316**(1): p. 5-14.
  696. Pagano, M., et al., *Protein kinase CK2: a newcomer in the'druggable kinome'*. *Biochemical Society Transactions*, 2006. **34**: p. 1303-1306.
  697. Guerra, B., et al., *Expression, purification and crystallization of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from Zea mays*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1998. **54**(Pt 1): p. 143-5.
  698. Niefind, K., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from Zea mays at 2.1 Å resolution*. *The EMBO Journal*, 1998. **17**(9): p. 2451.
  699. Niefind, K., et al., *Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme*. *The EMBO Journal*, 2001. **20**(19): p. 5320-5331.
  700. Raaf, J., et al., *The catalytic subunit of human protein kinase CK2 structurally deviates from its maize homologue in complex with the nucleotide competitive inhibitor emodin*. *Journal of molecular biology*, 2008. **377**(1): p. 1-8.

701. Guerra, B., et al., *CK2: A Protein Kinase in Need of Control*. Pharmacology & therapeutics, 1999. **82**(2-3): p. 303-313.
702. Ermakova, I., et al., *Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit*. Journal of molecular biology, 2003. **330**(5): p. 925-934.
703. Blencke, S., et al., *Characterization of a conserved structural determinant controlling protein kinase sensitivity to selective inhibitors*. Chemistry & biology, 2004. **11**(5): p. 691-701.
704. Litchfield, D.W., *Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death*. BIOCHEMICAL JOURNAL-LONDON-, 2003. **369**(1): p. 1-15.
705. Tuazon, P.T. and J.A. Traugh, *Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation*. Advances in second messenger and phosphoprotein research, 1991. **23**: p. 123.
706. Leroy, D., et al., *Chemical features of the protein kinase CK2 polyamine binding site*. Biochemistry, 1997. **36**(6): p. 1242-50.
707. Filhol, O., et al., *Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual subunits*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 975-87.
708. Solyakov, L., et al., *Regulation of casein kinase-2 (CK2) activity by inositol phosphates*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(42): p. 43403.
709. Azevedo, C. and A. Saiardi, *Reply to Shears: As knowledge of inositol pyrophosphates advances, wonder recedes*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **107**(5): p. 18.
710. Korolchuk, V.I., G. Cozier, and G. Banting, *Regulation of CK2 activity by phosphatidylinositol phosphates*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(49): p. 40796.
711. Salvi, M., et al., *Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2009. **1793**(5): p. 847-859.
712. Sarno, S., et al., *Basic residues in the 74-83 and 191-198 segments of protein kinase CK2 catalytic subunit are implicated in negative but not in positive regulation by the beta-subunit*. Eur J Biochem, 1997. **248**(2): p. 290-5.
713. DePaoli-Roach, A.A., et al., *Multiple phosphorylation of rabbit skeletal muscle glycogen synthase. Evidence for interactions among phosphorylation sites and the resolution of electrophoretically distinct forms of the subunit*. J Biol Chem, 1983. **258**(17): p. 10702-9.
714. Nielsen, J.N. and E.A. Richter, *Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise*. Acta Physiologica Scandinavica, 2003. **178**(4): p. 309-319.
715. Zhang, W.M., A.A. Depaoli-roach, and P.J. Roach, *Mechanisms of multisite phosphorylation and inactivation of rabbit muscle glycogen synthase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **304**(1): p. 219-225.
716. Al-Khouri, A.M., et al., *Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(42): p. 35195.
717. Maccario, H., et al., *PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366*. The Biochemical Journal, 2007. **405**(Pt 3): p. 439.
718. Meggio, F., O. Marin, and L.A. Pinna, *Substrate specificity of protein kinase CK2*. Cellular & molecular biology research, 1994. **40**(5-6): p. 401.
719. Wu, G., et al., *Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. 4(3).
720. Forde, J.E. and T.C. Dale, *Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate*. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2007. **64**(15): p. 1930.
721. Fiol, C.J., et al., *Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(29): p. 14042.
722. Fiol, C.J., et al., *Ordered multisite protein phosphorylation. Analysis of glycogen synthase kinase 3 action using model peptide substrates*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(11): p. 6061.
723. Roach, P.J., *Multisite and hierarchal protein phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(22): p. 14139.
724. Lickert, H., et al., *Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(7): p. 5090.
725. Serres, M., et al., *The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2*. Experimental cell research, 2000. **257**(2): p. 255-264.
726. Catimel, B., et al., *In situ phosphorylation of immobilized receptors on biosensor surfaces: Application to E-cadherin/[beta]-catenin interactions*. Analytical biochemistry, 2006. **357**(2): p. 277-288.
727. Joep, R.S. and G.V.W. Johnson, *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. Trends in Biochemical Sciences, 2004. **29**(2): p. 95-102.
728. Litchfield, D.W., et al., *Phosphorylation of the beta subunit of casein kinase II in human A431 cells. Identification of the autophosphorylation site and a site phosphorylated by p34cdc2*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(30): p. 20380.
729. Meggio, F., et al., *Phosphorylation and activation of protein kinase CK2 by p34cdc2 are independent events*. European Journal of Biochemistry, 1995. **230**(3): p. 1025-1031.
730. Lozeman, F.J., et al., *Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha. and the alpha.'subunits of casein kinase II*. Biochemistry, 1990. **29**(36): p. 8436-8447.
731. Duncan, J.S. and D.W. Litchfield, *Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics, 2008. **1784**(1): p. 33-47.
732. Bosc, D.G., *The catalytic subunits of protein kinase CK2, expression, covalent modification, and regulatory interactions*. 1998.
733. Sarno, S., et al., *Selectivity of 4, 5, 6, 7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed*

- inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). FEBS letters, 2001. **496**(1): p. 44.
734. Raaf, J., et al., *The CK2 alpha/CK2 beta interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules*. Chemistry & biology, 2008. **15**(2): p. 111.
  735. Filhol, O. and C. Cochet, *Protein Kinase CK2 in Health and Disease*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11): p. 1830-1839.
  736. Battistutta, R., *Protein Kinase CK2 in Health and Disease*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11): p. 1868-1889.
  737. Prudent, R. and C. Cochet, *New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box*. Chemistry & biology, 2009. **16**(2): p. 112-120.
  738. Pinna, L.A. and J.E. Allende, *Protein Kinase CK2 in Health and Disease: Protein kinase CK2: An ugly duckling in the kinome pond (Multi-author Review)*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11-12): p. 1795-1799.
  739. Dominguez, I., G.E. Sonenshein, and D.C. Seldin, *Protein Kinase CK2 in Health and Disease*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(11): p. 1850-1857.
  740. Guerra, B., et al., *Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 [beta] subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 [alpha] subunit, in mouse brain and testicles*. FEBS letters, 1999. **462**(3): p. 353-357.
  741. Xu, X., et al., *Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha catalytic subunit*. Nature genetics, 1999. **23**(1): p. 118.
  742. Seldin, D.C., et al., *Gene targeting of CK2 catalytic subunits*. Molecular and cellular biochemistry, 2008. **316**(1): p. 141-147.
  743. Lou, D.Y., et al., *The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(1): p. 131.
  744. Simpson, K.J., et al., *Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach*. Nature Cell Biology, 2008. **10**(9): p. 1027-1038.
  745. Krehan, A., et al., *Transcription factors ets1, NF-kappa B, and Sp1 are major determinants of the promoter activity of the human protein kinase CK2alpha gene*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(24): p. 18327.
  746. Pyerin, W. and K. Ackermann, *Transcriptional coordination of the genes encoding catalytic (CK2alpha) and regulatory (CK2beta) subunits of human protein kinase CK2*. Molecular and cellular biochemistry, 2001. **227**(1-2): p. 45.
  747. Pyerin, W. and K. Ackermann, *The genes encoding human protein kinase CK2 and their functional links*. Progress in nucleic acid research and molecular biology, 2003. **74**: p. 239-273.
  748. Ackermann, K., et al., *The catalytic subunit alpha gene of human protein kinase CK2 (CSNK2A2): genomic organization, promoter identification and determination of Ets1 as a key regulator*. Molecular and cellular biochemistry, 2005. **274**(1-2): p. 91.
  749. Bidwai, A.P., J.C. Reed, and C.V.C. Glover, *Cloning and disruption of CKB1, the gene encoding the 38-kDa subunit of Saccharomyces cerevisiae casein kinase II (CKII)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(18): p. 10395.
  750. Chantalat, L., et al., *Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization*. The EMBO Journal, 1999. **18**(11): p. 2930-2940.
  751. Leroy, D., et al., *Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2beta subunit*. Mol Cell Biochem, 1999. **191**(1-2): p. 43-50.
  752. Bertrand, L., et al., *Structure of the regulatory subunit of CK2 in the presence of a p21WAF1 peptide demonstrates flexibility of the acidic loop*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004. **60**(10): p. 1698-1704.
  753. Llorens, F., et al., *Eukaryotic translation-initiation factor eIF2beta binds to protein kinase CK2: effects on CK2alpha activity*. Biochemical Journal, 2003. **375**(Pt 3): p. 623.
  754. Stigare, J., et al., *A majority of CK2 alpha subunit is tightly bound to intranuclear compounds but not to the beta subunit*. Mol Cell Biol, 1993. **129**: p. 77-85.
  755. Filhol, O., J.L. Martiel, and C. Cochet, *Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex*. EMBO Rep, 2004. **5**(4): p. 351-5.
  756. Laudet, B., et al., *Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 363-73.
  757. Ermakova, I., et al., *Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit*. Journal of molecular biology, 2003. **330**(5): p. 925.
  758. Raaf, J., O.G. Issinger, and K. Niefind, *First Inactive Conformation of CK2 [alpha], the Catalytic Subunit of Protein Kinase CK2*. Journal of molecular biology, 2009. **386**(5): p. 1212-1221.
  759. Prudent, R., C. Sautel, and C. Cochet, *Structure-based discovery of small molecules targeting different surfaces of protein-kinase CK2*. Biochimica et biophysica acta, 2009.
  760. Pinna, L.A., *Protein kinase CK2: a challenge to canons*. Journal of cell science, 2002. **115**(20): p. 3873.
  761. Martel, V., et al., *Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation?* Ann N Y Acad Sci, 2002. **973**: p. 272-7.
  762. Zhang, C., et al., *Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2beta subunit*. Oncogene, 2002. **21**(23): p. 3754-64.
  763. Donella-Deana, A., et al., *Autocatalytic tyrosine-phosphorylation of protein kinase CK2 alpha and alpha subunits: implication of Tyr182*. Biochemical Journal, 2001. **357**(Pt 2): p. 563.
  764. Valero, E., et al., *Quaternary Structure of Casein Kinase 2*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(14): p. 8345.
  765. Niefind, K. and O.G. Issinger, *Primary and secondary interactions between CK2alpha and CK2beta lead to ring-like structures in the crystals of the CK2 holoenzyme*. Molecular and cellular biochemistry, 2005. **274**(1-2): p. 3.
  766. Bolanos-Garcia, V.M., et al., *Identifying interaction motifs in CK2 [beta]-a ubiquitous kinase regulatory subunit*. Trends in Biochemical Sciences, 2006. **31**(12): p. 654-661.
  767. Olsen, B.B., et al., *Biochemical characterization of CK2alpha and alpha'paralogues and their derived holoenzymes: evidence for the existence of a heterotrimeric CK2alpha'-holoenzyme forming trimeric complexes*. Molecular and cellular biochemistry, 2008. **316**(1-2): p. 37.
  768. Buchou, T. and C. Cochet, *[Protein kinase CK2: an enzyme that likes to be different]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(6-7): p. 709-16.

769. Huillard, E., et al., *Disruption of CK2{beta} in Embryonic Neural Stem Cells Compromises Proliferation and Oligodendrogenesis in the Mouse Telencephalon*. Mol Cell Biol. 2003. **23**(3): p. 908-15.
770. Maizel, A., et al., *Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process*. Development, 2002. **129**(15): p. 3545.
771. Tamaru, T., et al., *CK2 phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock*. Nature structural & molecular biology, 2009. **16**(4): p. 446-448.
772. Bibby, A.C. and D.W. Litchfield, *The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2beta*. International journal of biological sciences, 2005. **1**(2): p. 67.
773. Faust, M., et al., *Localization of individual subunits of protein kinase CK2 to the endoplasmic reticulum and to the Golgi apparatus*. Molecular and cellular biochemistry, 2001. **227**(1): p. 73-80.
774. Martel, V., et al., *Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells*. Mol Cell Biochem, 2001. **227**(1-2): p. 81-90.
775. Lüscher, B. and D.W. Litchfield, *Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines*. European journal of biochemistry/FEBS, 1994. **220**(2): p. 521.
776. Reed, J.C., A.P. Bidwai, and C.V. Glover, *Cloning and disruption of CKB2, the gene encoding the 32-kDa regulatory beta'-subunit of Saccharomyces cerevisiae casein kinase II*. J Biol Chem, 1994. **269**(27): p. 18192-200.
777. Canton, D.A. and D.W. Litchfield, *The shape of things to come: an emerging role for protein kinase CK2 in the regulation of cell morphology and the cytoskeleton*. Cellular signalling, 2006. **18**(3): p. 267-275.
778. Roussou, I. and G. Draetta, *The Schizosaccharomyces pombe casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit*. Molecular and cellular biology, 1994. **14**(1): p. 576.
779. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 325-330.
780. Jauch, E., et al., *In vivo functional analysis of Drosophila protein kinase casein kinase 2 (CK2) beta-subunit*. Gene, 2002. **298**(1): p. 29.
781. Dominguez, I., et al., *Protein kinase CK2 is required for dorsal axis formation in Xenopus embryos*. Developmental biology, 2004. **274**(1): p. 110-124.
782. Buchou, T., et al., *Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 908-15.
783. Blond, O., et al., *Knocking out the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice: gene dosage effects in ES cells and embryos*. Mol Cell Biochem, 2005. **274**(1-2): p. 31-7.
784. Boldyreff, B. and O.G. Issinger, *A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit*. FEBS letters, 1997. **403**(2): p. 197.
785. Chen, M., et al., *The casein kinase II beta subunit binds to Mos and inhibits Mos activity*. Molecular and cellular biology, 1997. **17**(4): p. 1904.
786. Guerra, B., O.G. Issinger, and J.Y.J. Wang, *Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory -subunit of protein kinase CK2*. Oncogene, 2003. **22**(32): p. 4933-4942.
787. Bren, G.D., K.N. Pennington, and C.V. Paya, *PKC-zeta-associated CK2 participates in the turnover of free I kappa B alpha*. Journal of molecular biology, 2000. **297**(5): p. 1245.
788. Kusk, M., et al., *Interactions of protein kinase CK2beta subunit within the holoenzyme and with other proteins*. Molecular and cellular biochemistry, 1999. **191**(1-2): p. 51.
789. Bjørling-Poulsen, M., et al., *The 'regulatory' beta-subunit of protein kinase CK2 negatively influences p53-mediated allosteric effects on Chk2 activation*. Oncogene, 2005. **24**(40): p. 6194.
790. Cheusova, T., et al., *Casein kinase 2-dependent serine phosphorylation of MuSK regulates acetylcholine receptor aggregation at the neuromuscular junction*. Genes & development, 2006. **20**(13): p. 1800.
791. Lee, N.Y., et al., *Casein kinase 2 {beta} as a novel enhancer of activin-like receptor-1 signaling*. The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2009.
792. Chaverneff, F., *CK2 Contributes to the Synergistic Effects of BMP7 and BDNF on Smad 1/5/8 Phosphorylation in Septal Neurons*. 2008.
793. Grein, S., et al., *Searching interaction partners of protein kinase CK2beta subunit by two-hybrid screening*. Molecular and cellular biochemistry, 1999. **191**(1-2): p. 105.
794. Bolanos-Garcia, V.M., et al., *Identifying interaction motifs in CK2beta--a ubiquitous kinase regulatory subunit*. Trends in Biochemical Sciences, 2006. **31**(12): p. 654.

# ABSTRACT

## Regulation of SNAIL1 Transcription Factor during Epithelial-Mesenchymal Transition in MCF10A mammary cells : involvement of protein-kinase CK2

Epithelial cells are key components for a plethora of vital functions in mammals, in particular because they can polarize and cohesively interact in a dynamic manner. These properties, grouped under the term of « Epithelial plasticity », can manifest themselves in different ways of which the most complex is Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), a process that drives a cohesive epithelial cell (or a group of cells) to strongly modify its organization and its protein composition, in order to gain migratory capacities. Such morphological changes have been first described during embryogenesis and are known to be under control of a series of transcription factors, some of which are also expressed during tumor progression. SNAIL1 factor (or SNAIL), whose role is determinant in many organogenesis steps, is also highly expressed in several metastatic cell lines and seems to participate in cancer cells dissemination. During the EMT process, SNAIL1 expression and localization, as well as its transcriptional activity, are under control of a complex regulation involving different post-translational modifications including phosphorylation. Therefore, the goal of my thesis was to understand regulation mechanisms of SNAIL1 by the protein-kinase CK2 in the context of EMT programs induction. This work was performed in two steps, of which the first was a biochemical characterisation of SNAIL1 phosphorylation by CK2 and its regulation by the CK2 $\beta$  regulatory subunit. In a second time, I focused on the consequences of CK2 inhibition by RNA interference in MCF10A mammary epithelial cells. This model highlighted the determining role of CK2 $\beta$  in maintaining epithelial phenotype and a cohesive architecture within MCF10A cells *in vitro*. Collectively, these findings suggest that protein-kinase CK2, under control of its regulatory subunit CK2 $\beta$ , acts as a negative regulator of SNAIL1 transcriptional level and protein stability in order to set against EMT induction.

Key-Words : Epithelial-Mesenchymal Transition, Transcription Factor, Protein-Kinase, Cell Signaling, RNA Interference



# RÉSUMÉ

## Régulation du facteur de transcription SNAIL1 au cours de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse dans les cellules mammaires MCF10A : implication de la protéine-kinase CK2

Les cellules épithéliales sont à la base de nombreuses fonctions vitales chez les mammifères, en particulier grâce à leurs propriétés de polarisation et de cohésion dynamiques regroupées sous le terme de « Plasticité Epithéliale ». Une manifestation originale de cette plasticité est la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (*EMT*, *Epithelial-Mesenchymal Transition*), un processus complexe qui permet à une cellule épithéliale (ou un groupe de cellules) de modifier sa composition et l'organisation de ses protéines pour se détacher de la masse cellulaire à laquelle elle appartient, et ainsi acquérir une organisation de type fibroblastique propice à la motilité cellulaire. Ce phénomène, initialement mis en évidence pour son rôle dans le développement embryonnaire, met en jeu une régulation fine, sous le contrôle de facteurs de transcription dont certains semblent également jouer un rôle au cours de la progression tumorale. Le facteur SNAIL1 (ou SNAIL), dont le rôle est déterminant au cours de la mise en place de nombreux organes, est également fortement exprimé dans les lignées métastatiques et pourrait participer à la dissémination des cellules cancéreuses au sein de l'organisme. Au cours de l'EMT, son expression, sa localisation et son activité sont soumises à une régulation complexe qui implique plusieurs modifications post-traductionnelles, en particulier la phosphorylation. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de comprendre les mécanismes de régulation de SNAIL1 par la protéine-kinase CK2 au cours de l'EMT. Ce travail a été réalisé en deux étapes dont la première fût une caractérisation biochimique de la phosphorylation de SNAIL1 par CK2 et sa régulation par la sous-unité régulatrice CK2 $\beta$ . Dans un deuxième temps, je me suis penché sur l'étude des conséquences de l'inhibition du complexe CK2 par ARN interférence dans les cellules épithéliales mammaires MCF10A. Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle déterminant de CK2 $\beta$  dans le maintien de l'expression d'un phénotype épithélial et d'une architecture cohésive au sein des cellules MCF10A en culture *in vitro*. L'ensemble de ces résultats suggère en effet que la protéine-kinase CK2, sous le contrôle de sa sous-unité régulatrice CK2 $\beta$ , exerce une régulation négative sur le niveau d'expression transcriptionnelle et la stabilité protéique de SNAIL1 visant à s'opposer à l'induction de l'EMT.

Mots-Clé : Transition Epithélio-Mésenchymateuse, Facteur de Transcription, Protéine-Kinase, Signalisation Cellulaire, ARN Interférence